

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología y Pediatría

Programa de Doctorado: Farmacología y Terapéutica



Tesis Doctoral

Enfermedad Metabólica en el Paciente
con Normopeso

Antonio Jesús Omiste Romero

Málaga, 2017



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología y Pediatría

Programa de Doctorado: Farmacología y Terapéutica

TESIS DOCTORAL

Enfermedad Metabólica en el Paciente con Normopeso

Antonio Jesús Omiste Romero

Directores de la tesis:

Francisco José Tinahones Madueño


Isabel Moreno Indias

Málaga, 2017



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Antonio Jesús Omiste Romero

 <http://orcid.org/0000-0001-5329-8881>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



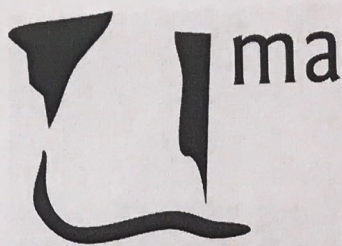
Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. Francisco José Tinahones Madueño, Doctor en Medicina y Cirugía, Director de la Unidad Intercentros de Endocrinología y Nutrición de los Hospitales Virgen de la Victoria y Regional Universitario de Málaga y Profesor Titular del Departamento de Medicina y Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

CERTIFICA: Que el trabajo que se expone en la memoria de la Tesis Doctoral realizada por Antonio Jesús Omiste Romero con el título **“Enfermedad Metabólica en el Paciente con Normopeso”** corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

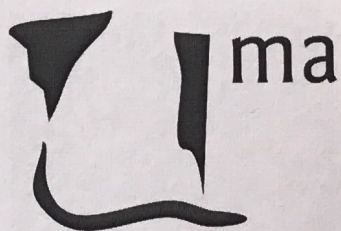
La presente memoria ha sido realizada bajo mi dirección, considerando que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometida a juicio por el tribunal nombrado por la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones legalmente vigentes a los efectos oportunos, firmo el presente certificado, con lo que autorizo la lectura de la misma.

Director de la tesis:

Dr. Francisco José Tinahones Madueño

Málaga, Enero de 2017



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dña. Isabel Moreno Indias, Doctora por la Universidad de las Palmas de Gran Canaria

CERTIFICA: Que el trabajo que se expone en la memoria de la Tesis Doctoral realizada por Antonio Jesús Omiste Romero con el título **“Enfermedad Metabólica en el Paciente con Normopeso”** corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

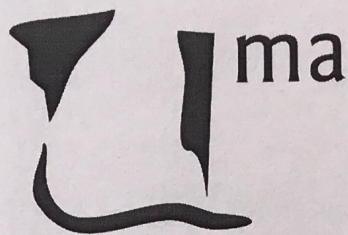
La presente memoria ha sido realizada bajo mi dirección, considerando que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometida a juicio por el tribunal nombrado por la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones legalmente vigentes a los efectos oportunos, firmo el presente certificado con lo que autorizo la lectura de la misma.

Directora de la tesis:

Dra. Isabel Moreno Indias

Málaga, Enero de 2017



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Yo, **Antonio Jesús Omiste Romero**, declaro que soy el autor del presente trabajo de investigación titulado **“Enfermedad Metabólica en el Paciente con Normopeso”**, que ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Francisco José Tinahones Madueño y la Dra. Isabel Moreno Indias.

Y para que así conste firmo el presente certificado.

Antonio Jesús Omiste Romero
Málaga, Enero de 2017

A mi familia

A mis padres y abuelos

A Santi

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis: a Paco, por proponerme formar parte de este proyecto y guiarme durante todo el recorrido, y a Isa por enseñarme tanto, por su paciencia, sus consejos y sus palabras de ánimo y motivación constantes. Ambos piezas claves para la realización de este trabajo y para mi formación como investigador. Agradecer también a todas las personas que forman parte de este proyecto y sin los que no se podría haber completado: a Wil, Said, Dani y Juan, porque este trabajo es el resultado de un gran equipo coordinado e integrado del que estoy orgulloso de pertenecer.

Ha sido un largo recorrido hasta completar mi formación, y he necesitado de muchas personas para que ésta sea plena. Desde mi profesora de biología, Amparo, la primera que me enseñó a amar esta rama de la ciencia, hasta mi tío Antonio, con el que di los primeros pasos en la medicina, me asesoró para elegir esta especialidad y que aún hoy sigue siendo mi referente.

Al servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Regional de Málaga, donde completé mi formación, y a todos sus miembros – médicos, enfermeras, auxiliares, dietistas, secretarias – porque de cada uno he aprendido mucho y porque han pasado a ser parte de mi familia. En especial a Stella por su dedicación, por sus ganas incansables de enseñar y por guiarme en mis primeros pasos en la investigación; a ella le debo gran parte de mis conocimientos en esta materia y el deseo incesante de seguir aprendiendo.

Al servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Virgen de la Victoria y al personal de Clínicas Rincón, donde actualmente ejerzo mi profesión. Por acogerme como a uno más desde el momento en que me incorporé, hacerme sentir que formaba parte del equipo desde el minuto uno y por regalarme una sonrisa, un chiste o un guiño cuando me ven aparecer.

A mis amigos, que me han acompañado todos estos años, desde Motril hasta Málaga, pasando por Madrid, Granada y Córdoba, a los de siempre y a los de ahora, a los que están cerca y a los que ya no puedo ver a diario, a los que me conocen desde siempre, y a los que me han enseñado a conocerme. De la etapa del colegio, el instituto, la universidad y la residencia: cada uno me ha

Agradecimientos

aportado algo para llegar a ser quien soy hoy y con ellos he disfrutado de momentos inolvidables. En especial a los que han aparecido en mi vida en los últimos años e incluso en los últimos meses, a los que vienen de dos en dos o de uno en uno; a ellos debo la fuerza y el empuje para sacar adelante este trabajo y mi felicidad.

A Cristina y Victoria, mis compañeras de fatiga, de dudas, de incertidumbres, de días malos y buenos, paños de lágrimas y origen de risas, muchas risas: porque sin ellas este documento no habría llegado a su fin y mi vida no sería tan plena como lo es. Y a todos mis compañeros doctorandos por su ayuda y su apoyo, porque aunque cada uno hiciera su trabajo, me han hecho sentir que trabajábamos en equipo.

A mi familia, a quien en su día se sintió orgulloso de poderme ver ejercer como médico antes de despedirse, y a los que actualmente me siguen viendo crecer científica y personalmente, porque son los responsables de ello. A los que me han acompañado siempre y a las nuevas incorporaciones, que han sabido hacerse un hueco importante en mi vida. Gracias por acompañarme todos estos años en los momentos amargos, pero sobre todo en los buenos, por darle color a mi vida. En especial a Loreto, por darle además color a este manuscrito.

Por último agradecer a los responsables de la base de mi educación, mis padres, porque a ellos les debo mi constancia y esfuerzo para cumplir mis objetivos y el ser como soy hoy. Por su compañía, por llevarme de la mano y sostenerme desde siempre, por compartir y celebrar conmigo los grandes momentos de mi vida. Cualquier cosa que diga sería insuficiente para expresarles mi gratitud. A mi hermano Juan, por ser mucho más que eso, por enseñarme tanto y por guiarme. Y a Santi, por conseguir con sus ocurrencias y su sonrisa que los días difíciles sean los mejores.

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	21
INTRODUCCIÓN	27
1. Obesidad y enfermedad metabólica	27
1.1. Definición y clasificación de la obesidad	27
1.2. Prevalencia de la obesidad	30
1.3. Etiología de la obesidad	30
1.4. Complicaciones de la obesidad	37
1.5. Síndrome metabólico	39
2. Fisiología del tejido adiposo	42
2.1. Estructura y función del tejido adiposo	42
2.2. Características del tejido adiposo	43
2.2.1. Características anatómicas	44
2.2.2. Características celulares	45
2.2.2.1. Adipocitos	45
2.2.2.2. Macrófagos	46
2.2.2.3. Vascularización e innervación	49
2.2.3. Características moleculares	50
2.2.3.1. Receptores	50
2.2.3.2. Adipoquinas	51
2.2.4. Características fisiológicas y metabólicas	54
2.2.5. Características clínicas y pronósticas	56
2.2.5.1. Riesgos metabólicos	56
2.2.5.2. Síndrome metabólico	57
2.2.5.3. Riesgo vascular y eventos cardiovasculares	57
2.2.5.4. Predicción de mortalidad	58
2.2.5.5. Efectos de la pérdida de peso	59

3. Inflamación	59
4. Adipogénesis	63
4.1. Expansibilidad del tejido adiposo	63
4.1.1. Capacidad neogénica del tejido adiposo	63
4.1.1.1. Aproximación molecular	65
4.1.2. Capacidad apoptótica del tejido adiposo	68
4.1.3. Angiogénesis del tejido adiposo	72
5. Lipogénesis	74
5.1. Receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas	75
5.2. Proteína transportadora de ácidos grasos 4	76
5.3. Otros factores clave implicados en la lipogénesis del tejido adiposo	76
6. Fenotipos discordantes	78
6.1. Enfermedad metabólica	79
6.2. Prevalencia	80
6.3. Criterios diagnósticos	82
6.4. Fisiopatología	84
6.4.1. Inflamación subclínica	84
6.4.2. Expansibilidad e insuficiencia del tejido adiposo	91
6.4.3. Otros posibles mecanismos	94
6.5. Resultado de la intervención en los fenotipos discordantes	96
6.6. Persistencia del fenotipo obeso metabólicamente sano en el tiempo	97
JUSTIFICACIÓN	101
HIPÓTESIS	103

OBJETIVOS	105
MATERIAL Y MÉTODOS	107
1. Diseño del estudio	107
2. Población de estudio	107
2.1. Criterios de Inclusión	108
2.2. Criterios de Exclusión	108
2.3. Clasificación de los sujetos	108
3. Variables de estudio y procedimientos	109
3.1. Medidas antropométricas y parámetros analíticos	109
3.2. Muestras de tejido adiposo para expresión de mRNA	110
3.3. Aislamiento de RNA y expresión génica	110
3.4. Aislamiento y expansión de la fracción de las células derivadas del estroma vascular del tejido adiposo subcutáneo y visceral	112
3.5. Diferenciación adipogénica	113
4. Análisis estadístico	114
RESULTADOS	117
1. Características clínicas	117
2. Características antropométricas y bioquímicas de los pacientes	117
3. Marcadores bioquímicos plasmáticos y su asociación con el síndrome metabólico	119
4. Medidas de los macrófagos del tejido adiposo y su asociación con el síndrome metabólico	120
5. Medidas de citoquinas inflamatorias y su asociación con el síndrome metabólico.	127
6. Lipogénesis, adipogénesis y sus asociaciones con el síndrome Metabólico	133

7. Marcadores de adipogénesis en cultivos celulares diferenciados en medios adipogénicos	134
8. Citoquinas inflamatorias y marcadores de lipogénesis y adipogénesis en una subpoblación de sujetos sin criterios de síndrome metabólico comparados con sujetos con al menos tres criterios	138
9. Variables del síndrome metabólico como parámetros predictivos de los macrófagos del tejido adiposo	140
DISCUSIÓN	143
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	159
ANEXOS	185
Anexo 1: Consentimiento Informado	187
Anexo 2: Aprobación del comité de ética	195
Anexo 3: Artículo publicado en Translational Research titulado: “Adipose tissue infiltration in normal-weight subjects and its impact on metabolic function”	197
Anexo 4: Editorial en relación con el artículo publicado en Translational Research titulado: “Metabolic dysfunction and adipose tissue macrophages: is there more to glean from studying the lean?”	213

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- ABCA1: ATP-binding cassette transporter , subfamilia a, miembro 1
- ADRP: proteína relacionada con la diferenciación adiposa
- AGL: ácidos grasos libres
- Agrp: proteína relacionada con Aguti
- AHA: American Heart Association
- AMA-CC1: quimioquina CC-1 asociada a la activación alternativa de macrófagos
- ApoB: apolipoproteína B
- ATP-III: Adult Treatment Panel III
- ATP: adenosin trifosfato
- BCL2: proteína 2 del linfoma de células B
- C-HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
- C-LDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
- CART: transcriptor relacionado con cocaína y anfetaminas
- CCK: colecistoquinina
- CCR2: receptor-2 de quimioquinas C-C
- CEBP α : Proteína de unión al enhancer CCAAT alfa
- COX-1: ciclooxigenasa 1
- COX-2: ciclooxigenasa 2
- CSF R1: factor estimulante de colonias R1
- DAG: dieta alta en grasas
- DM2: diabetes mellitus tipo 2
- FABP4: proteína transportadora de ácidos grasos 4
- FASN: sintasa de ácidos grasos
- GCTC: glucocorticoides

- GLP-1: péptido 1 similar al glucagón
- GLUT-4: transportador de glucosa tipo 4
- hO-MSCs: células madre multipotentes derivadas de tejido adiposo
- IDF: International Diabetes Federation
- IFN- γ : interferón gamma
- IL-10: interleuquina 10
- IL-12: interleuquina 12
- IL-13: interleuquina 13
- IL-1 β : interleuquina 1 beta
- IL-23: interleuquina 23
- IL-4: interleuquina 4
- IL-6: interleuquina 6
- IL-8: interleuquina 8
- IMC: índice de masa corporal
- IR: insulino-resistencia
- LEP: leptina
- LHS: lipasa sensible a hormonas
- LPL: lipoproteínlipasa
- LPS: lipopolisacárido derivado de patógenos
- M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos
- MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1
- MCR4: receptor 4 de la melanocortina
- ME: metabólicamente enfermo
- MerTK: mer tirosin quinasa
- MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II
- MIP1 α : proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
- mRNA: RNA mensajero
- MS: metabólicamente sano

- MTA: macrófagos del tejido adiposo
- NF- κ B: factor de transcripción nuclear kappa-beta
- NO: óxido nítrico
- NPME: normopeso metabólicamente enfermo
- NPME3: sujetos con normopeso que reúnen tres criterios de síndrome metabólico
- NPMS: normopeso metabólicamente sano
- NPMS0: sujetos con normopeso sin ningún criterio de síndrome metabólico
- NPY: neuropéptido Y
- ObME: obeso metabólicamente enfermo
- ObMS: obeso metabólicamente sano
- OR: odds ratio
- PAI-1: factor activador del plasminógeno-1
- PCR-US: proteína C reactiva ultrasensible
- PCR: proteína C reactiva
- PKA: proteín quinasa A
- PPAR γ : receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas
- PYY: péptido YY
- RE: retículo endoplasmático
- SARP: proteína relacionada con la apoptosis
- SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
- SFRP: proteína secretada relacionada con frizzled
- SME: sobrepeso metabólicamente enfermos
- SMS: sobrepeso metabólicamente sanos
- SNS: sistema nervioso simpático
- TAB: tejido adiposo blanco

- TASC: tejido adiposo subcutáneo
- TAV: tejido adiposo visceral
- TG: triglicéridos
- TGF- β : factor de crecimiento transformante beta
- TNF α : factor de necrosis tumoral alfa
- TRAIL: ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF
- TWEAK: inductor débil de la apoptosis similar a TNF
- UCP1: proteína desacoplante 1
- VEGF-R: receptor del factor de crecimiento de endotelio vascular
- VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular
- WHO: World Health Organization

INTRODUCCIÓN

1. Obesidad y enfermedad metabólica

1.1. Definición y clasificación de la obesidad

La World Health Organization (WHO) define el sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud¹.

Se trata de una enfermedad metabólica crónica de origen multifactorial que conlleva a una afectación física y psíquica de la persona que la padece y que se asocia a patologías que limitan la esperanza de vida, deteriorando la calidad de la misma. Puede determinar la proyección vital, social y laboral del individuo. Sus proporciones son epidémicas y ocasiona un gran coste económico a todos los sistemas sanitarios. La característica primordial que define a la obesidad es el exceso de grasa corporal, lo cual supone sobrepasar el rango de normalidad que se sitúa entre el 12-20% del peso corporal en hombres y el 20-30% en mujeres. La obesidad se asocia a un exceso de peso en relación con la estatura, si bien el peso no es, de forma aislada, el factor definitorio de la obesidad. Una persona de constitución atlética con gran desarrollo osteomuscular tiene un peso elevado para su estatura; sin embargo, sólo será obeso si acumula exceso de grasa. Por otro lado, una persona considerada con peso normal para su talla puede ser obesa si tiene exceso de grasa corporal. También hay que tener en cuenta que en determinadas situaciones puede producirse aumento de peso sin exceso de grasa, como en la insuficiencia cardiaca congestiva, la cirrosis hepática o la insuficiencia renal, en las cuales hay aumento de líquido en el organismo. Siempre teniendo en cuenta las puntualizaciones anteriores, en la práctica clínica se emplea el índice

de masa corporal (IMC) que es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilogramos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). Existe consenso internacional para considerar a una persona adulta (18-60 años) con sobrepeso, si el IMC es igual o superior a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ y con obesidad cuando éste es igual o superior a $30 \text{ kg}/\text{m}^2$, tanto en hombres como en mujeres².

La Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) establece dos tipos de clasificaciones³:

- En función del exceso de peso corporal:
 - Sobrepeso grado I: IMC $25,0$ - $26,9 \text{ kg}/\text{m}^2$
 - Sobrepeso grado II (preobesidad): IMC $27,0$ - $29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$
 - Obesidad de tipo I: IMC $30,0$ - $34,9 \text{ kg}/\text{m}^2$
 - Obesidad de tipo II: IMC $35,0$ - $39,9 \text{ kg}/\text{m}^2$
 - Obesidad de tipo III (mórbida): IMC $40,0$ - $49,9 \text{ kg}/\text{m}^2$
 - Obesidad de tipo IV (extrema): IMC $\geq 50 \text{ kg}/\text{m}^2$

En la población juvenil e infantil se utilizan como criterios para definir el sobrepeso y la obesidad los valores específicos por edad y sexo de los percentiles 85 y 97 del IMC, respectivamente.

El IMC proporciona la medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población, puesto que es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades. Sin embargo, hay que considerarla a título indicativo porque es posible que no se corresponda con el mismo nivel de grosor en diferentes personas¹.

- En función de la distribución de la grasa corporal:
 - Obesidad abdominovisceral o viscerportal, (tipo androide): Predominio del tejido adiposo en la mitad superior del cuerpo: cuello, hombros, sector superior del abdomen. Este tipo de obesidad, tanto en el varón como en la mujer, se asocia con un aumento del riesgo de

desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DM2), aterosclerosis, hiperuricemia e hiperlipemia, consecuencia directa del estado de insulino-resistencia (IR). Para definir obesidad abdominovisceral utilizamos los siguientes parámetros:

- I. Índice cintura-cadera: perímetro cintura (cm)/ perímetro cadera (cm). Valores superiores a 0,8 en mujeres y 1 en varones indican obesidad androide.
 - II. Circunferencia de Cintura: Su valor de referencia varía según las distintas poblaciones.
 - III. Diámetro Sagital: Presenta una buena correlación con la cantidad de grasa visceral. En posición decúbito dorsal, la grasa abdominal aumenta el diámetro anteroposterior del abdomen. Se considera un valor normal hasta 25 cm.
- Obesidad femoroglútea (tipo ginecoide): Se caracteriza por presentar adiposidad en glúteos, caderas, muslos y mitad inferior del cuerpo.

Existe una creciente evidencia sugerida por la WHO de que los puntos de corte de IMC están obsoletos y no se deben aplicar a todas las poblaciones. Para superar las clasificaciones erróneas, las mediciones directas de porcentaje de grasa corporal sería una herramienta mejor para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad⁴. Existen estudios de composición corporal mediante densitometría de composición corporal donde se objetiva que el screening para adiposidad en sujetos con IMC normal podría identificar mejor a las personas con mayor riesgo de enfermedad cardiometabólica así como de mortalidad cardiovascular⁴. En función del porcentaje de grasa corporal, podríamos definir como sujetos obesos aquellos que presentan porcentajes de grasa por encima de los valores considerados normales, que son del 12 al 20% en varones y del 20 al 30% en mujeres adultas⁵.

1.2. Prevalencia de la obesidad

Aunque previamente se ha considerado un problema de los países de altos ingresos, el sobrepeso y la obesidad están ahora en aumento en los países de bajos y medianos ingresos, especialmente en los entornos urbanos. En los países en desarrollo con economías emergentes (clasificados por el Banco Mundial como países de bajos y medianos ingresos), la tasa de incremento de sobrepeso y obesidad en la infancia ha sido más de 30% mayor que la de los países desarrollados¹.

Según un informe reciente de la WHO, en 2014 más de 1,8 billones de adultos tenían sobrepeso según criterio de IMC ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$). De ellos, más de 600 millones eran obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$). 42 millones de niños menores de 5 años tenían sobrepeso u obesidad en 2013.

El sobrepeso y la obesidad están en el quinto puesto en el riesgo de mortalidad global. Al menos 2,8 millones de adultos mueren cada año como resultado de tener sobrepeso u obesidad. La prevalencia mundial de obesidad se duplicó entre 1980 y 2014¹.

1.3. Etiología de la obesidad

A través de la historia de la evolución, animales y humanos han desarrollado mecanismos que promueven la acumulación de tejido graso durante los períodos de "abundancia", permitiendo así la supervivencia durante los períodos de "hambruna". Sin embargo, lo que fue una fortaleza, se ha convertido en una debilidad en el actual entorno obesogénico, dada la facilidad para la adquisición de alimentos de alta energía disponibles sin ser necesario para ello alta actividad física. Como consecuencia, la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas en países industrializados y en desarrollo,

lo que ha generado un importante problema de salud pública, ya que la obesidad está asociada con comorbilidades significativas y aumento de la mortalidad⁶.

Tradicionalmente se ha considerado que la principal causa de obesidad y el sobrepeso es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las calorías gastadas. Los cambios en los patrones de alimentación y actividad física son a menudo el resultado de los cambios ambientales y sociales asociados con el desarrollo y la falta de políticas de apoyo en sectores como la salud, la agricultura, el transporte, el urbanismo, el medio ambiente, el procesamiento de alimentos, la distribución, la comercialización y la educación¹.

Sin embargo se ha producido un cambio en este paradigma dados los hallazgos encontrados en los últimos años en el estudio de la obesidad de manera que, aunque el balance energético es un factor relevante en la etiología de la obesidad, hay muchos otros factores implicados en el desarrollo de ésta, principalmente a nivel metabólico, por lo que estamos hablando de una enfermedad multifactorial.

Hay cierto acuerdo en considerar de forma independiente aquellos tipos de obesidad que tienen un origen genético y que se asocian a problemas de desarrollo físico e intelectual, ya que la causa está establecida ya sea por alteraciones pleiotrópicas dominantes (síndrome de Prader Willi), autosómicas recesivas (síndrome de Bardet-Biedl) o ligadas al cromosoma X (síndrome de Wilson-Turner). De la misma manera ocurre con la obesidad derivada de causas endocrinológicas conocidas, como son algunos casos de hipogonadismo o hipercortisolismo. De cualquier forma, en la mayor parte de pacientes que desarrollan obesidad es difícil establecer una única causa, ya que la obesidad se debe a la interacción entre genes y ambiente.

Sin embargo, la creciente prevalencia de obesidad no puede ser atribuida directamente a cambios en el componente genético, aunque algunas variantes genéticas que permanecieron en su día silentes, pueden ahora manifestarse debido a la alta disponibilidad de energía y al alto grado de sedentarismo. Aunque existen diferencias interindividuales en la respuesta a diversas intervenciones dietéticas o de ejercicio físico, se han llevado a cabo escasos intentos para establecer diferencias en función del genotipo⁷.

El desequilibrio del balance energético puede ser debido a una falta de control en la ingesta o en el gasto energético, a fallos en la regulación de las reservas lipídicas o a desajustes en la distribución de nutrientes entre los tejidos⁸. La obtención de energía de los alimentos se regula por mecanismos neuroendocrinos, puesto que la fase cefálica de la digestión está en buena parte dirigida por la actividad de neuropéptidos hipotalámicos, como el neuropéptido Y (NPY), o la proteína relacionada con Aguti (Agrp), que junto con factores gastrointestinales (como la ghrelina) que actúan a nivel hipotalámico, promueven la sensación de apetito que favorece la ingesta de nutrientes⁹. El acto de comer genera otras señales gastrointestinales, que en el hipotálamo originan sensación de saciedad. Esta limitación de la ingesta de energía es mediada esencialmente por la colecistoquinina (CCK), el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), el péptido YY (PYY) y la leptina, que actúan en el hipotálamo contrarrestando las señales de la ghrelina, NPY y Agrp, junto con otros péptidos hipotalámicos como el transcriptor relacionado con cocaína y anfetaminas (CART) y las melanocortinas, que actúan sobre receptores específicos del hipotálamo lateral, que a su vez segrega las orexinas (o hipocretinas) que también promueven el apetito. Hay que destacar que un buen número de casos de obesidad (cerca del 5%) se han podido atribuir a los polimorfismos del receptor 4 de la melanocortina (MCR4)¹⁰. En la figura 1 y 2 se presenta la regulación de la homeostasis energética.

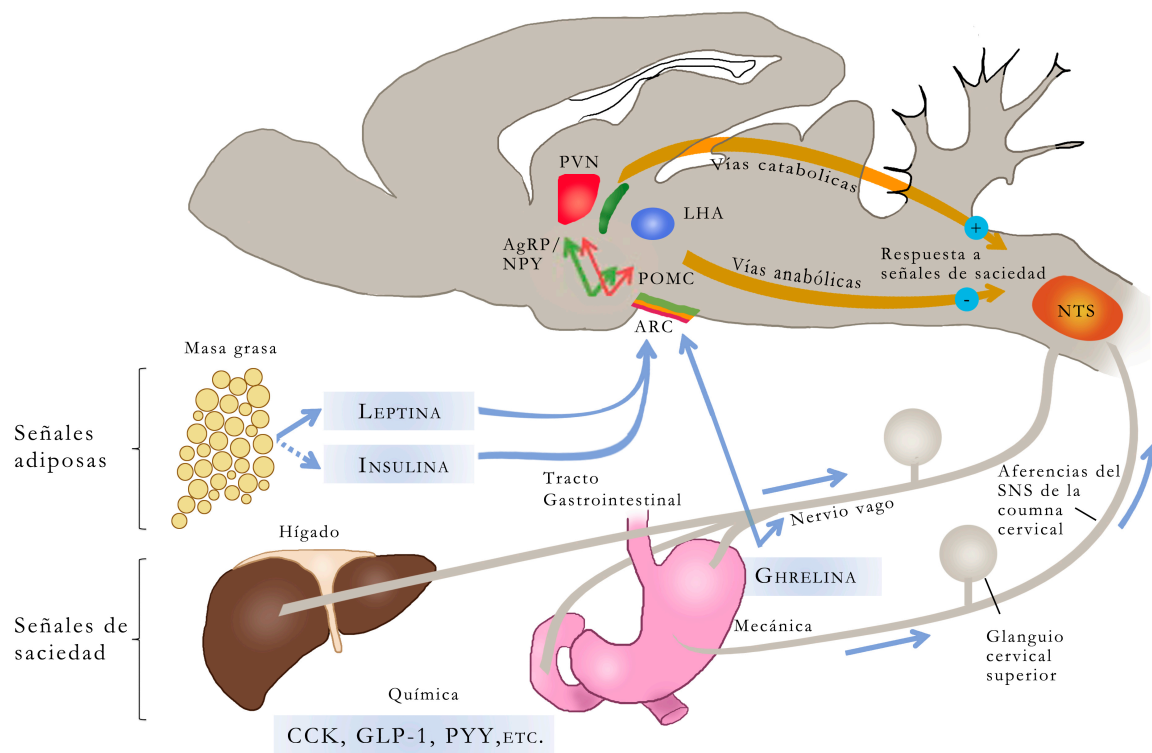


Figura 1.- Modelo resumen de los diferentes niveles de control de la homeostasis energética. Adaptado de Schwartz *et al.*¹¹

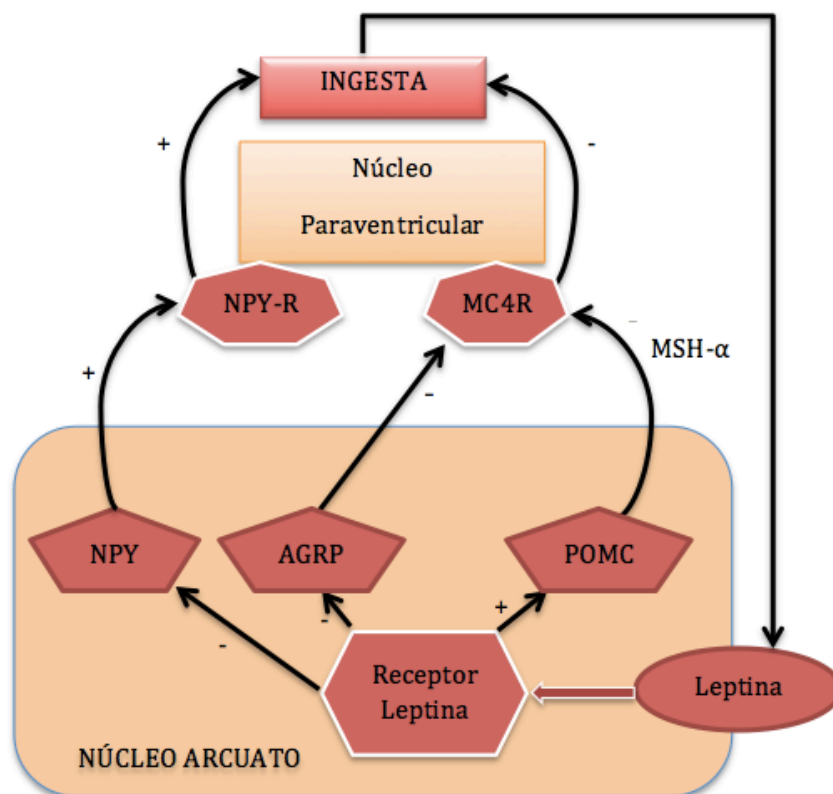


Figura 2.- Regulación de la ingesta en el sistema nervioso central. Adaptado de Zurbano-Inchusta *et al.*¹²

En la parte opuesta de la balanza encontramos los mecanismos implicados en la pérdida de energía, en forma de calor. Esta pérdida procede de la termogénesis, que en humanos se activa al aumentar la tasa metabólica basal, inducida por la acción de nutrientes y hormonas. Los roedores y otros mamíferos disponen de un tejido especializado, el tejido adiposo marrón, que cuenta con una gran dotación de mitocondrias que contienen la proteína desacoplante 1 (UCP1), que permite desacoplar el metabolismo oxidativo de la generación de adenosin trifosfato (ATP). La activación (frío, exceso de ingesta) o inhibición (ayuno, gestación) de la actividad UCP1 permite a estos animales ajustar la liberación de calor. En los humanos, salvo en el período de adaptación del neonato, el tejido adiposo marrón está circunscrito a unas localizaciones residuales escasas y se considera que su funcionalidad es muy limitada. Tampoco la presencia de posibles actividades desacoplates (UCP2 y UCP3) en otros tejidos parece que juegue un papel significativo en la termogénesis, a pesar de que su sobreexpresión en animales puede determinar un fenotipo no obeso¹³.

El control del peso corporal también está condicionado por la actividad metabólica y, en concreto, por la dinámica de las reservas grasas del organismo.

Así, el adipocito, célula predominante en el tejido adiposo, desempeña un papel paracrino y endocrino que autorregula su capacidad de almacenamiento y que interviene en el control hipotalámico de la ingesta y en los mecanismos de utilización y almacenamiento de las reservas. Este tejido, por ejemplo, segrega la leptina, una citoquina a la que se ha atribuido la propiedad de ser la señal de las reservas energéticas y que es capaz de modular la secreción de neuropéptidos que controlan la ingesta. También se ha tenido que reinterpretar el papel de la insulina, puesto que propicia la saciedad cuando se inyecta a nivel ventricular, hecho que avala su papel fundamental en

el sistema de control del peso corporal y hace que la interrelación entre este control y el metabolismo intermediario sea mucho más estrecha de lo que se había supuesto¹⁴. En realidad, la situación es mucho más compleja, puesto que otras hormonas, como los esteroides, pueden jugar un papel determinante en la manifestación de la obesidad. Así, el cortisol regula la diferenciación del adipocito a través de su propia síntesis en tejido adiposo a partir de cortisona. Además, los glucocorticoides parece que son los efectores del incremento de peso en situaciones de estrés y pueden interferir en la acción de la insulina y propiciar los depósitos de lípidos en el tejido adiposo¹⁵.

El papel de las hormonas esteroideas también se ha implicado en la regulación de la adiposidad. La disminución de los niveles normales de andrógenos o estrógenos se traduce generalmente en un incremento de la obesidad visceral. El almacenamiento de estrona en su forma esterificada con ácidos grasos (acilestrona), y el efecto inhibitor que ejerce sobre la expresión de la leptina, nos permiten decir que este compuesto podría desempeñar un papel en el control del peso corporal¹⁶.

Últimamente ha ido cobrando fuerza la posibilidad de que el control del peso corporal pueda estar también regulado por variaciones en la actividad metabólica de enzimas implicadas en la síntesis de lípidos (acetil CoA carboxilasa), oxidación de sustratos (aconitasa) o almacenamiento de triglicéridos (TG) (glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial)¹⁷.

Además, se ha visto que diversas moléculas reguladoras del tejido adiposo blanco (TAB), pueden estar moduladas por el estímulo de nutrientes, modificando estos su actividad. Al parecer, la lipasa sensible a hormonas (LHS) no es indispensable para la movilización de los TG, puesto que la actividad lipásica depende de la acción de la perilipina (proteína que recubre la vacuola de TG) y de una nueva lipasa, la desnutrina, que apenas se expresa en modelos animales de obesidad y sí aparece, en cambio, en situaciones de

privación de alimento¹⁸.

De estos últimos ejemplos se puede deducir que, si bien la actividad de estas enzimas puede deberse en última instancia a causas genéticas, dicha actividad puede modularse metabólicamente y, por tanto, estaría sujeta a las interacciones con los demás elementos de control implicados en la regulación del peso corporal, además de por los nutrientes.

También se ha barajado la posibilidad de que la obesidad pueda ser causada por infecciones virales. El hecho de que se hayan identificado diferentes virus que favorezcan el desarrollo de la obesidad en animales y que los humanos obesos presenten una mayor prevalencia de anticuerpos contra el adenovirus-36, y que éste al ser inyectado en ratones y pollos promueva la acumulación de grasa, ha permitido argumentar que las infecciones víricas pueden estar en la raíz del desarrollo de algún tipo de obesidad¹⁹.

Por último, diferentes estudios epidemiológicos en humanos, y otros realizados en modelos animales, sugieren que un desequilibrio nutricional o metabólico en la madre durante períodos críticos del desarrollo de las crías, incluida la etapa fetal y la lactancia, puede condicionar o programar el metabolismo futuro y la tendencia a padecer o no determinadas enfermedades en la edad adulta, entre ellas el síndrome metabólico^{20,21}. Dichos efectos en la programación metabólica pueden ser atribuidos a cambios epigenéticos, es decir, alteraciones estables en la expresión génica debidas a cambios en la metilación del ADN y modificaciones de histonas, que pueden transmitirse a las siguientes generaciones.

El panorama descrito de momento sirve para ir situando las piezas de este rompecabezas, pero la incansable búsqueda de los genes implicados en la expresión de los compuestos reguladores descritos (sin olvidar los posibles polimorfismos) y, especialmente, el conocimiento de las interacciones entre

los distintos genes, permitirá en el futuro completar el mapa genético/metabólico de la obesidad. Estas interacciones pueden deberse a la presencia de diferentes variantes de determinados genes que influyen sobre la respuesta a la dieta, pero también pueden ser atribuibles a diferencias en la expresión génica frente a la nutrición en ciertos individuos²².

1.4. Complicaciones de la obesidad

Un IMC elevado es un factor de riesgo importante para las enfermedades no transmisibles, como las enfermedades cardiovasculares, pero también aumenta el riesgo de diabetes, trastornos musculoesqueléticos, y varios tipos de cáncer. El riesgo para estas enfermedades no transmisibles aumenta con el incremento en el IMC. Por tanto, el 44% de la carga de diabetes, el 23% de la carga de la enfermedad isquémica cardíaca y entre el 7% y el 41% de cierta carga del cáncer, son atribuibles al sobrepeso y la obesidad¹.

La adiposidad, la fracción de la masa total del cuerpo compuesta de lípidos neutros almacenada en el tejido adiposo, está estrechamente correlacionada con parámetros fisiológicos importantes tales como la presión arterial, la sensibilidad a la insulina, y las concentraciones de TG y leptina²³.

Existen fuertes correlaciones positivas entre el grado de adiposidad y varios trastornos asociados con la obesidad, como hipertensión, dislipemia e intolerancia a la glucosa²⁴. Hasta ahora los estudios han demostrado que la masa grasa visceral está más estrechamente relacionada con la patología asociada a la obesidad²⁵.

La morbilidad asociada al sobrepeso y la obesidad se ha comprobado en muchas alteraciones de salud entre las que cabe destacar la DM2, la dislipemia, la hipertensión, la enfermedad coronaria y cerebrovascular, la colelitiasis, la osteoartrosis, la insuficiencia cardíaca, el síndrome de apnea del

sueño, algunos tipos de cáncer, alteraciones menstruales, la esterilidad y alteraciones psicológicas. En la Tabla 1 se resumen las alteraciones más comúnmente asociadas a la obesidad. El clínico debe realizar un esfuerzo en determinar las patologías asociadas al exceso ponderal, y especialmente aquellas susceptibles de mejoría tras la pérdida de peso³.

Enfermedad cardiovascular arteriosclerótica
- Cardiopatía isquémica
- Enfermedad cerebrovascular
Otras alteraciones cardiorrespiratorias
- Insuficiencia cardíaca congestiva
- Insuficiencia respiratoria
- Síndrome de apnea obstructiva del sueño
Alteraciones metabólicas
- Resistencia a la insulina y DM2
- Hipertensión arterial
- Dislipemia
- Hiperuricemia
Alteraciones de la mujer
- Disfunción menstrual
- Síndrome de ovarios poliquísticos
- Infertilidad
- Aumento del riesgo perinatal
- Incontinencia urinaria
Digestivas
- Colelitiasis
- Esteatohepatitis no alcohólica
- Cirrosis
- Reflujo gastroesofágico, hernia de hiato
Músculo-esqueléticas
- Artrosis
- Lesiones articulares
- Deformidades óseas

Otras alteraciones

- Insuficiencia venosa periférica
- Enfermedad tromboembólica
- Cáncer (mujer: vesícula y vías biliares, mama y endometrio en posmenopausia; hombre: colon, recto y próstata).
- Hipertensión intracraneal benigna
- Alteraciones cutáneas (estrías, acantosis nigricans, hirsutismo, foliculitis, intertrigo)
- Alteraciones psicológicas
- Alteraciones psicosociales
- Disminución en la calidad de vida
- Trastornos del comportamiento alimentario

Tabla 1.- alteraciones asociadas a la obesidad. Adaptado de Salas-Salvadó *et al.*³

1.5. Síndrome metabólico

El síndrome metabólico lo constituye un grupo de factores de riesgo asociados tradicionalmente a la obesidad abdominal que incluyen la IR, la dislipemia aterogénica y la hipertensión arterial. Puede así considerarse una entidad clínica especial que confiere un alto riesgo de enfermedad cardiovascular y/o DM2. Si bien la patogénesis del síndrome metabólico y de cada uno de sus componentes es compleja y no es conocida lo suficiente, la obesidad central y la IR se han considerado los ejes centrales del síndrome. Existen diferentes definiciones de síndrome metabólico, entre las que cabe destacar la realizada por la WHO en 1998²⁶ y los criterios del Adult Treatment Panel III (ATP-III), plasmados en el tercer informe de la National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in adults²⁷. Esta última clasificación es más simple y útil desde el punto de vista clínico, ya que la clasificación de la WHO requiere la realización de un test de sobrecarga oral de glucosa y la determinación de insulina. Más recientemente están tomando fuerza los criterios establecidos

por la International Diabetes Federation (IDF)²⁸, donde se especifican puntos de corte para el perímetro de la cintura propios de la población europea (y otras poblaciones). En la Tabla 2 se definen los criterios de ATP-III e IDF, los más utilizados en la actualidad.

Criterios		ATP-III	IDF
Perímetro de cintura (cm)	Varones	≥ 102	≥ 94*
	Mujeres	≥ 88	≥ 80*
Triglicéridos (mg/dl)		≥ 150	≥ 150**
c-HDL (mg/dl)	Varones	< 40	< 40
	Mujeres	< 50	< 50
Tensión arterial (mmHg) o toma de tratamiento antihipertensivo	TAS	≥ 130	≥ 130
	TAD	≥ 85	≥ 85
Glucemia plasmática en ayunas (mg/dl)		≥ 110	≥ 100***

Tabla 2.- Definición de síndrome metabólico según los criterios del ATP-III²⁷ y la IDF²⁸.

c-HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad

* En población europea. En japoneses los puntos de corte considerados son de 90 y 85cm en varones y mujeres respectivamente. En población china y asiática son de 90 y 80cm en varones y mujeres, respectivamente

** O tratamiento específico para el aumento de TG

*** Si la glucemia es superior a esta cifra, se recomienda la realización de una sobrecarga oral de glucosa, aunque no es necesaria para el diagnóstico del síndrome metabólico

La prevalencia del síndrome metabólico es diferente entre poblaciones debido a la influencia de la raza, sexo y edad en la definición del mismo. De acuerdo con los criterios ATP-III²⁷, la prevalencia media en Estados Unidos se encuentra entre el 20-30%²⁹. La prevalencia estimada de síndrome metabólico en España según diferentes estudios epidemiológicos y va desde un 17% en Segovia³⁰, el 24,4% en Canarias³¹ y hasta el 28,9% en Valencia³². Estas diferencias pueden estar motivadas por la edad de los participantes, el IMC promedio de la muestra y la contribución porcentual de cada uno de los componentes al síndrome metabólico.

En el estudio DORICA se realizó un análisis comparativo de la sensibilidad y especificidad de diferentes indicadores antropométricos y se evaluaron distintos puntos de corte mediante curvas ROC para estimar la presencia de factores de riesgo cardiovascular asociados a la obesidad³³. El perímetro de cintura y el índice cintura/altura mostraron los mejores resultados. En sujetos de entre 25 y 60 años, la probabilidad de presentar factores de riesgo cardiovascular aumenta a partir de valores para el índice cintura/altura $\geq 0,53$ en varones y $\geq 0,51$ en mujeres. El riesgo de presentar factores de riesgo cardiovascular se duplica en las mujeres a partir de un IMC de 27 y en los varones a partir de un IMC de 30. El riesgo de presentar factores de riesgo cardiovascular en mujeres con perímetro de cintura de 80cm es equiparable al riesgo para un IMC de 25 (Odds Ratio [OR]= 1,5). Para valores de perímetro de cintura de 88 cm, la OR se estima en torno a 3,0, lo mismo que para un IMC de 30 kg/m². En los varones, estos valores de cintura son de 88 y 98 cm, respectivamente.

La obesidad, y especialmente la visceral, confiere un aumento del riesgo de morbimortalidad, no solamente de origen cardiovascular, sino también por otras causas, como es el caso del cáncer o la DM2 y sus complicaciones.

La mayoría de estudios epidemiológicos poblacionales observan que la mortalidad empieza a aumentar cuando el IMC supera los 25 kg/m²³⁴. Los individuos con un IMC ≥ 30 kg/m², presentan un aumento del riesgo de mortalidad total y derivada de enfermedades cardiovasculares aproximado de entre el 50 y el 100% respecto de la población con un IMC de 20 a 25 kg/m². El aumento de la mortalidad es modesto cuando el IMC se sitúa entre 25 y 30 kg/m²³⁵.

2. Fisiología del tejido adiposo

2.1. Estructura y función del tejido adiposo

El tejido adiposo, que representa aproximadamente el 20% del peso corporal en un adulto normal, es el tejido más plástico en todos los organismos multicelulares, presentando un remodelado constante junto con el aumento y pérdida de peso³⁶. Rompiendo con el paradigma clásico en el que el tejido adiposo se presentaba exclusivamente como un tejido de reserva en forma de TG, actualmente se sitúa como un regulador clave del balance energético, jugando un papel activo en el almacenamiento de lípidos, regulación, síntesis y secreción de una amplia gama de productos endocrinológicos a la circulación sistémica que influyen en el metabolismo global y la homeostasis³⁷. Una de las principales funciones de las adipocinas es la señalización del estado de repleción de tejido adiposo al cerebro y otros órganos, pero también es participante activo en el proceso angiogénico³⁸.

El tejido adiposo está compuesto por una mezcla heterogénea de células grasas (adipocitos) rodeado de tejido estromal que contiene a sus precursores (preadipocitos), células endoteliales, pericitos, fibroblastos, células inflamatorias (fundamentalmente macrófagos y linfocitos T), progenitores y células madre mesenquimales (figura 3). Los diferentes tipos de tejido adiposo, se diferencian no sólo por su localización (subcutáneo, intraabdominal o perivisceral, pericárdico, perirenal, perimuscular...) sino también por su arquitectura (TAB o marrón), su actividad metabólica y su perfil de secreción de adipocinas³⁶.

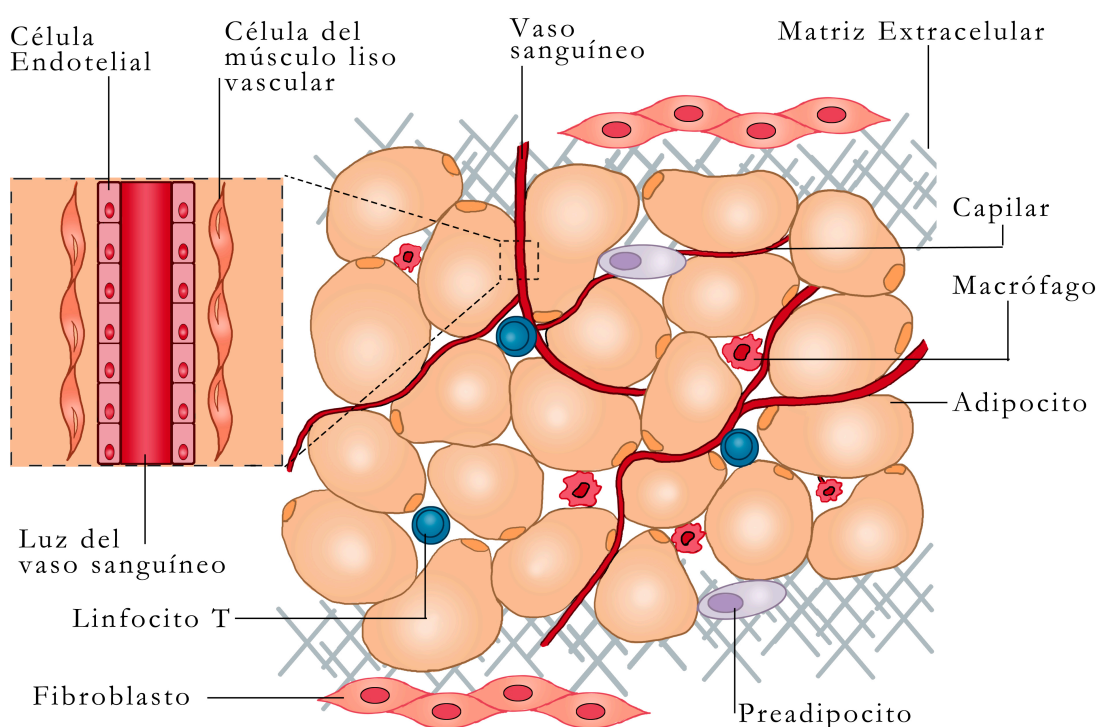


Figura 3.- Esquema de la estructura del tejido adiposo. Adaptado de Ouchi *et al.*³⁹

2.2. Características del tejidos adiposo

La obesidad abdominal conlleva a un mayor riesgo de desarrollar diabetes y futuros eventos cardiovasculares que la obesidad periférica o glúteo-femoral. La grasa presente alrededor de las vísceras abdominales en mesenterio y epiplón fundamentalmente, conocida como grasa visceral, es diferente de la presente en las zonas subcutáneas (grasa subcutánea). El tipo de adipocitos, su función endocrina, la actividad lipolítica, la respuesta a la insulina y otras hormonas es diferente en función del tejido adiposo en estudio, bien sea tejido adiposo subcutáneo (TASC) o tejido adiposo visceral (TAV)⁴⁰. Estos tejidos difieren en cuanto a características anatómicas, celulares, moleculares, fisiológicas, clínicas y pronósticas⁴⁰.

El TAV se considera que es funcional y metabólicamente diferente del

TASC^{40,41}. De esta manera, tradicionalmente, el TAV se ha asociado con el riesgo de enfermedad metabólica y cardiovascular^{42,43}.

El acúmulo de grasa subcutánea representa un tampón fisiológico normal para el consumo del exceso energético (dieta hipercalórica) con el gasto de energía limitado (inactividad física). Actúa como un sumidero metabólico donde se almacenan el exceso de ácidos grasos libres (AGL) y glicerol en forma de TG en los adipocitos⁴⁴. Cuando se excede la capacidad de almacenamiento del TASC o se deteriora su capacidad para generar nuevos adipocitos debido a cualquier predisposición o estrés genético, la grasa comienza a acumularse en áreas fuera del tejido subcutáneo (área de almacenamiento natural de la energía). El estrés crónico conduce a niveles elevados de cortisol que pueden conducir al acúmulo de grasa a nivel de TAV⁴⁵.

Las diferencias anatómicas y fisiológicas entre el TAV y TASC explican el aumento de los riesgos metabólicos y cardiovasculares asociados a la obesidad abdominal⁴⁰.

2.2.1. Características anatómicas

Las principales áreas de depósito de grasa subcutánea son las regiones femoro-glútea, la espalda y la pared abdominal anterior.

Alrededor del 80% del total de grasa corporal está en la zona subcutánea⁴³. La grasa abdominal está presente en dos depósitos principales: subcutánea e intraabdominal.

La grasa visceral supone hasta el 10-20% de la grasa total en varones y 5-8% en mujeres⁴³. La cantidad de grasa visceral aumenta con la edad en ambos sexos⁴³.

Debido a su posición anatómica, la sangre venosa de la grasa visceral drena directamente al hígado a través de la vena porta. Esto difiere con la grasa subcutánea, que drena a través de las venas sistémicas. El drenaje portal de la grasa visceral proporciona acceso directo a los AGL y adipoquinas hepáticas segregadas por los adipocitos viscerales. Las adipoquinas activan los mecanismos inmunes hepáticos con la producción de mediadores inflamatorios tales como la proteína C reactiva (PCR)⁴⁶.

2.2.2. Características celulares

El tejido adiposo está formado por un gran número de adipocitos, otras células no adiposas, matriz de tejido conjuntivo, vascular y tejidos neurales. El componente celular no adipocítico incluye macrófagos, células inmunes, preadipocitos y fibroblastos⁴⁰.

2.2.2.1. Adipocitos

Los adipocitos constituyen el principal componente celular del tejido adiposo y son los depósitos de almacenamiento principales de energía en forma de gotitas de TG. Los nuevos adipocitos pequeños actúan como sumideros o tampones, que absorben con avidez los AGL y TG en el período postprandial. A medida que los adipocitos crecen, se vuelven disfuncionales. Los adipocitos grandes tienen mayor tendencia a ser IR, hiperlipolíticos y resistentes al efecto antilipolítico de la insulina. El TAV contiene mayor número de adipocitos grandes en relación con el TASC, que contiene adipocitos pequeños. Estos adipocitos pequeños son más sensibles a la insulina y tienen una alta avidez por los AGL y la absorción de TG, previniendo su depósito en tejidos no adiposos^{46,47}.

2.2.2.2. Macrófagos

Los macrófagos son una población heterogénea que se origina de los monocitos que se mueven del torrente circulatorio a los tejidos periféricos y que juegan un papel fundamental en el sistema inmune con funciones importantes en la inmunidad innata y adquirida. En la inmunidad innata, la principal función de estas células es la respuesta a patógenos y la modulación de la respuesta inmune adaptativa a través del procesamiento y la presentación de antígenos. Los macrófagos colaboran con las células T y B a través de interacciones mediadas por citoquinas, quimioquinas, enzimas y metabolitos del ácido araquidónico; pero los macrófagos también están implicados en otras funciones homeostáticas⁴⁸.

Los macrófagos derivados de distintos progenitores pueden adquirir fenotipos y funciones diferentes dependiendo del microambiente⁴⁹. Las diversas funciones de los macrófagos están relacionadas con el tipo de interacción del receptor en el macrófago y la presencia de citoquinas⁵⁰.

La presencia de macrófagos en el tejido adiposo (conocidos como macrófagos del tejido adiposo – MTA) se notificó por primera vez hace unos 15 años⁵¹. Estudios posteriores demostraron que la infiltración de los macrófagos en este tejido era mayor en la obesidad⁵². Partiendo de este hallazgo, muchos autores han estudiado las consecuencias de la infiltración de los macrófagos en el tejido adiposo. Entre las primeras observaciones destacó la presencia de citoquinas inflamatorias en este tejido y el incremento de la insulinemia⁵². Para poder explicar estos fenómenos, investigaciones posteriores observaron que, al igual que ocurre en otras células del sistema inmune como los linfocitos T, los macrófagos constituyen una población heterogénea de células que pueden ser polarizadas hacia un fenotipo conocido como M1 o “activado clásicamente” o bien M2 o “activado alternativamente”

tanto a nivel plasmático como a nivel de tejido adiposo⁵³. El fenotipo M1 está inducido por estímulos inflamatorios con lipopolisacárido (LPS) derivado de bacterias Gram (-) solo o en combinación con interferón gamma (IFN- γ) o citoquinas (factor de necrosis tumoral alfa - TNF α - o factor estimulante de colonias de macrófagos - M-CSF -) y da lugar a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Por otro lado, el fenotipo M2 está inducido por la exposición a interleuquina 4 (IL-4) e interleuquina 13 (IL-13), que da lugar a la secreción de citoquinas anti-inflamatorias⁵⁴. La mayoría de los estudios *in vitro* muestran que esta activación alternativa se caracteriza por una mayor expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) y de receptores de manosa (CD206) en su superficie⁵⁵. La nomenclatura M1 / M2 se deriva de las citoquinas de linfocitos Th1 y Th2 que están asociadas con estos fenotipos de macrófagos⁴⁸. *In vitro*, la activación de los macrófagos puede estar promovida directamente por patrones moleculares asociados con la microbiota intestinal, como LPS⁵⁶. Esta activación se conoce como innata y se asemeja a la activación M1, pero difiere de los macrófagos M1, macrófagos innatos activados que no poseen actividad fagocítica y que no pueden producir interleuquina 12 (IL-12) biológicamente activa⁵⁷. Por esta razón, Martínez *et al.* subclasificaron a los macrófagos M1 como macrófagos clásicos e innatos activados en M1a y M1b respectivamente⁵⁸.

Los macrófagos M2 se pueden generar por varios estímulos, tales como glucocorticoides y complejos de inmunoglobulina / receptor Toll-like. En general, las células M2 pueden controlar la respuesta inflamatoria y la inmunidad adaptativa Th2, recoger desechos, promover la angiogénesis y remodelar y reparar tejidos⁵⁹. Los macrófagos M2 se caracterizan por la producción de altos niveles de interleuquina 10 (IL-10) y la baja expresión de IL-12 e interleuquina 23 (IL-23)⁵⁹.

En general, los macrófagos M2 se dividen en 3 subconjuntos: M2a, M2b y M2c, basado en el perfil de expresión génica^{58,60,61}.

El subtipo M2a es generado por la IL-4 e IL-13, que son producidas principalmente por las células Th2, mastocitos y basófilos. Ambas citoquinas pueden inhibir a los mediadores pro-inflamatorios de los macrófagos tales como interleuquina 1 beta (IL-1 β), TNF α , interleuquina 6 (IL-6), IL-12, IFN γ y aniones superóxido. Las células M2a también expresan proteínas que promueven la fibrogénesis, la reparación y proliferación de tejidos y la proliferación tumoral^{62,63,64,65}.

El M2b se origina por el ligando de IL-1R o por exposición a complejos inmunes y LPS. M2b se caracterizan por presentar una producción baja de IL-12 y alta de IL-10, un perfil de citoquinas que favorece la respuesta inmune Th2⁶⁶.

El subtipo M2c se genera por mediación de IL-10, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), M-CSF o glucocorticoides y se caracteriza por la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias y el incremento en la actividad de eliminación de residuos⁴⁸. Wang *et al.* describieron un subtipo M2 adicional, es decir macrófago M2d, que se caracterizaba por una baja tasa de IL-12 y una alta producción de IL-10 y tenía algunas características similares a los macrófagos asociados a tumores⁶⁷.

En la figura 4 se resume la polarización de los macrófagos tras abandonar el torrente circulatorio.

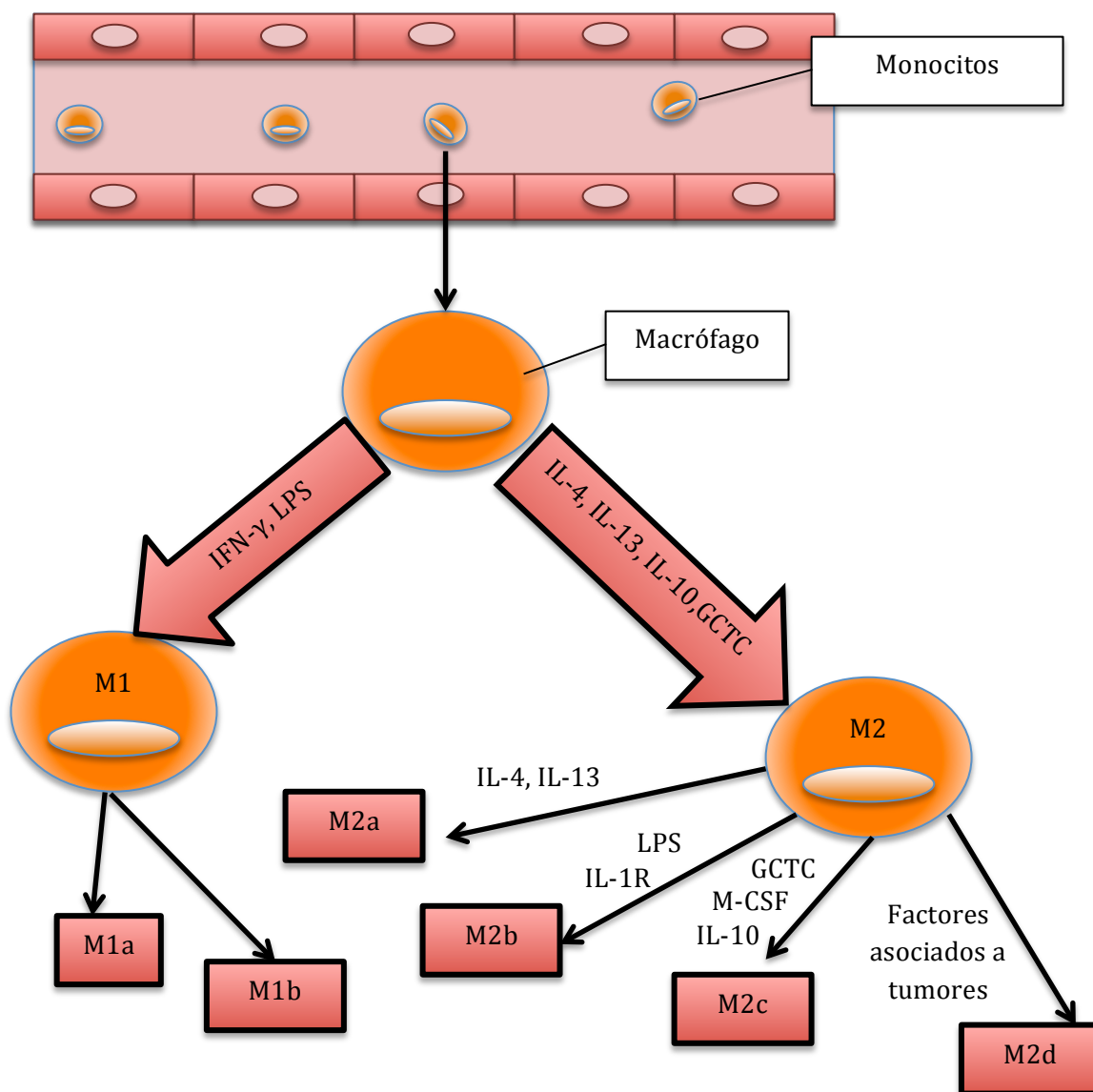


Figura 4.- Polarización de los macrófagos. GCTC: glucocorticoides.

2.2.2.3. Vascularización e innervación

El TAV se caracteriza por estar más vascularizado e innervado que el TASC⁴⁰. La irrigación del tejido adiposo juega un papel clave en la fisiopatología del mismo. Recientes progresos en el estudio de la inflamación asociada a la obesidad sugieren que la disfunción de la vasculatura ocurre en el tejido adiposo antes que la IR⁶⁸. En la obesidad, la densidad capilar no logra satisfacer la demanda de crecimiento del tejido adiposo. Este fallo conduce a la disfunción de la microcirculación y a una perfusión sanguínea alterada, lo

que origina una respuesta de hipoxia local en el tejido adiposo. La respuesta de hipoxia en los adipocitos y macrófagos es una nueva base celular para la inflamación crónica que analizaremos posteriormente con mayor detalle⁶⁸.

En cuanto a la regulación nerviosa, el tejido adiposo está innervado mayoritariamente por el sistema nervioso simpático (SNS), cuya activación da lugar a la lipólisis mediada por noradrenalina dependiente del estímulo del receptor β 3-adrenérgico⁶⁹. Los adipocitos viscerales, en comparación con los del TASC, son más sensibles a la lipólisis inducida por catecolaminas y menos sensibles a la inhibición dependiente del receptor α 2-adrenérgicos de la lipólisis^{70,71}, además de presentar mayor nivel de β 3-adrenérgicos⁷². El SNS también se ha visto implicado en la regulación de la proliferación de adipocitos⁶⁹ a parte de en el control de la lipólisis.

2.2.3. Características moleculares

2.2.3.1. Receptores

Las células del tejido adiposo están provistas de receptores que se activan mediante tres tipos de señales⁴⁰:

- Señales químicas en forma de hormonas endocrinas circulantes que llegan a los adipocitos a través del torrente sanguíneo.
- Señales químicas de moléculas biológicamente activas (adipoquinas) que se generan localmente en el tejido adiposo y activan las células del tejido adiposo vecino a través de mecanismos paracrinos.
- Señales nerviosas procedentes del sistema nervioso central y de la activación de los receptores adrenérgicos específicos en el tejido adiposo, por ejemplo, receptores β 3-adrenérgicos y receptores α 2-adrenérgicos.

Hay variaciones regionales en la densidad, la afinidad y la transducción de señales de los distintos receptores del tejido adiposo.

Los receptores de glucocorticoides están implicados en la regulación metabólica y la distribución de la grasa corporal⁷³. Presentan una variación regional en cuanto a su concentración, siendo más elevada en el TAV⁷⁴, al igual que ocurre con los receptores androgénicos⁴⁴. En varones, a partir de los 50 años de edad, con el descenso de la testosterona, se almacena más grasa en los depósitos del TAV, y el TASC tiende a disminuir⁷⁵. Los receptores estrogénicos sin embargo, muestran una variación regional en su concentración en función de las diferencias de género y una mayor capacidad de unión en el TASC⁷⁶. El estrógeno promueve el acúmulo en el TASC femoro-glúteo periférico, que puede ser protector. El déficit de estrógenos contribuye al aumento del TAV en las mujeres posmenopáusicas^{44,75}.

2.2.3.2. Adipoquinas

El tejido adiposo es capaz de sintetizar una serie de péptidos, proteínas y citoquinas. Estas moléculas biológicamente activas se conocen como adipoquinas. Actualmente, se han identificado más de 50 adipoquinas⁷⁷.

Los adipocitos maduros actúan como un órgano endocrino activo y paracrino a través de una red de comunicación con otros tejidos, como por ejemplo el SNS y el cerebro, que pueden influir en el apetito. También influyen en el balance energético, la inmunidad, la sensibilidad a la insulina, la angiogénesis, la presión sanguínea, el metabolismo de los lípidos y la homeostasis. Los adipocitos contribuyen al estado proinflamatorio generado en la obesidad y la diabetes y son capaces de sintetizar proteínas proinflamatorias y antiinflamatorias. Segregan proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) que puede inducir la infiltración de macrófagos y su activación en el tejido adiposo. Los macrófagos son una fuente importante de citoquinas inflamatorias tales como el TNF α y la IL-6. Se han descrito múltiples adipoquinas^{77,78,79} que incluyen citoquinas, factores de crecimiento

clásicos, proteínas que participan en la homeostasis vascular, la homeostasis de la glucosa, la angiogénesis y respuestas de fase aguda.

Una de las adipocinas clave en la homeostasis del tejido adiposo es la leptina, cuya función principal es la señalización del estado de reserva energética, por lo que reduce el apetito y aumenta el gasto energético. Además está implicada en funciones de inmunidad, estimula la angiogénesis y la hematopoyesis, induce la proliferación y migración de células del músculo liso vascular y mejora la agregación plaquetaria. La obesidad está asociada con niveles elevados de leptina, siendo un marcador sensible para predecir el riesgo cardiovascular y el síndrome metabólico⁸⁰.

Por el contrario, la adiponectina, otra adipocina básica en la fisiología de este tejido, está disminuida en la obesidad abdominal. Se trata de una proteína plasmática similar al colágeno producida por los adipocitos cuyo principal papel es antiaterogénico, ya que inhibe la expresión de moléculas de adhesión y proliferación de las células del músculo liso vascular, suprime la transformación de macrófagos a células espumosas e induce la producción de factores anti-inflamatorios importantes como la IL-10. Por otro lado, aumenta la sensibilidad a la insulina, inhibe la neoglucogénesis y favorece la lipólisis^{40,81}.

En cuanto a las citoquinas proinflamatorias cabe destacar la IL-6, el TNF α y la PCR, las cuales se encuentran elevadas en la obesidad abdominal. El 30% de la IL-6 se produce en el tejido adiposo y es el mayor regulador de producción de PCR hepática. En cuanto a sus funciones, TNF α activa el factor de transcripción nuclear kappa-beta (NF-kB) lo que hace que, al igual que la IL-6 y la PCR, aumente la inflamación vascular, siendo factores proaterogénicos. Por otro lado también disminuyen la sensibilidad a la insulina lo que puede ser un predictor del desarrollo de diabetes, sobre todo en el caso de la PCR⁴⁰.

2.2.3.2.1. Interacciones entre adipoquinas

El TNF α y las interleuquinas aumentan la expresión del gen de la leptina y los niveles circulantes de leptina^{82,83}. El TNF α contribuye a la hiperleptinemia relacionada con la obesidad mediante la regulación de la liberación de leptina por parte de los adipocitos⁸². La producción de factor activador del plasminógeno 1 (PAI-1) se correlaciona significativamente con la de TNF α , destacando un posible aporte local de TNF α a la regulación de la producción de PAI-1 por el tejido adiposo. La adiponectina inhibe los cambios inducidos por el TNF α en la expresión de moléculas de adhesión en los monocitos y en la respuesta inflamatoria del endotelio⁸⁴. El TNF α es un inhibidor potente de la expresión y secreción de adiponectina en el TAB⁸⁵.

Existen diferencias entre el TAV y TASC con respecto a la capacidad de sintetizar y liberar adipoquinas como se muestra en la tabla 3.

	Capacidad de síntesis y liberación de adipoquinas	Tejido predominante
Leptina	Su expresión y niveles plasmáticos aumentan a medida que aumentan los depósitos de TG del tejido adiposo ^{79,82}	TASC ⁴³
Adiponectina	Correlación negativa significativa de su nivel plasmático con el peso corporal ⁸⁶	TAV ⁴⁴
TNF α	Mayor en obesidad abdominal	TAV ^{87,88,89}
PCR	Sus niveles se relacionan con el perímetro de cintura y el TAV ^{90,91}	TAV ^{87,88,89}
IL-6	Mayor en obesidad abdominal	TAV ^{87,88,89}
MCP-1		TAV ⁹¹
Angiotensinógeno	El tejido adiposo constituye la fuente más importante de angiotensinógeno después del hígado ⁴³	TAV ^{92,93}
PAI-1	Mayor producción en la obesidad. El tejido adiposo omental segrega PAI-1 ⁹⁴	TAV ⁹⁴

Tabla 3.- Capacidad de síntesis y liberación de adipoquinas y tejido adiposo de mayor producción.

2.2.4. Características fisiológicas y metabólicas

En la tabla 4 se describen las características metabólicas del tejido adiposo y las diferencias existentes entre ambos subtipos.

	Características	Diferencias entre TASC y TAV
IR	Impide que la glucosa y el exceso de grasa entren en la célula y se oxiden.	<ul style="list-style-type: none"> - Los adipocitos del TAV^{95,96} y los más grandes^{97,98} son más IR. - La cantidad de grasa visceral se asocia con variaciones en la IR⁹⁹. - La IR puede ser uno de los factores más importantes que unen la adiposidad visceral abdominal con el riesgo cardiovascular.
Tasa de lipólisis – liberación de AGL y glicerol	Los AGL inducen IR. En el hígado, la insulina inhibe la gluconeogénesis y la glucogenólisis y estimula la glucogenogénesis.	<ul style="list-style-type: none"> - Los adipocitos del TAV son metabólicamente más activos y tienen mayor actividad lipolítica que los del TASC ^{100,101}. - El TAV es más susceptible a la lipólisis inducida por catecolaminas y menos a la acción anti-lipolítica de la insulina. - El grado de supresión de los AGL tras la ingesta es diferente a nivel abdominal y periférico en las personas obesas. - La liberación de AGL es mayor en los individuos con obesidad abdominal⁴⁴.
Absorción de glucosa		El TAV tiene mayor tasa de captación de glucosa mediada por la insulina que el TASC
Absorción de AGL y TG	Los nuevos adipocitos, pequeños y más sensibles a la insulina, actúan como tampones de gran alcance, absorbiendo con avidez los AGL circulantes y los TG en el período postprandial ^{44,102} .	Los adipocitos pequeños del TASC tienen gran avidez por la absorción de AGL y TG. Las células del TASC pueden actuar como un amortiguador para la circulación de AGL y TG, pero pueden claudicar si alcanzan su capacidad máxima, acumulándose en tejidos que no son adecuados para su almacenamiento ⁴⁴ . El TASC de la pared abdominal tiene una mayor capacidad de absorción de TG y de liberación de AGL por kilogramo que la grasa femoral ^{46,99} .

Tabla 4.- Características metabólicas del tejido adiposo. Adaptado de Ibrahim *et al.*⁴⁰

Cuando hay un incremento de la lipólisis en el tejido adiposo, se produce una mayor movilización e infiltración patológica de AGL en tejido muscular, páncreas e hígado, generando alteraciones en el perfil metabólico del sujeto (figura 5) ⁴⁰.

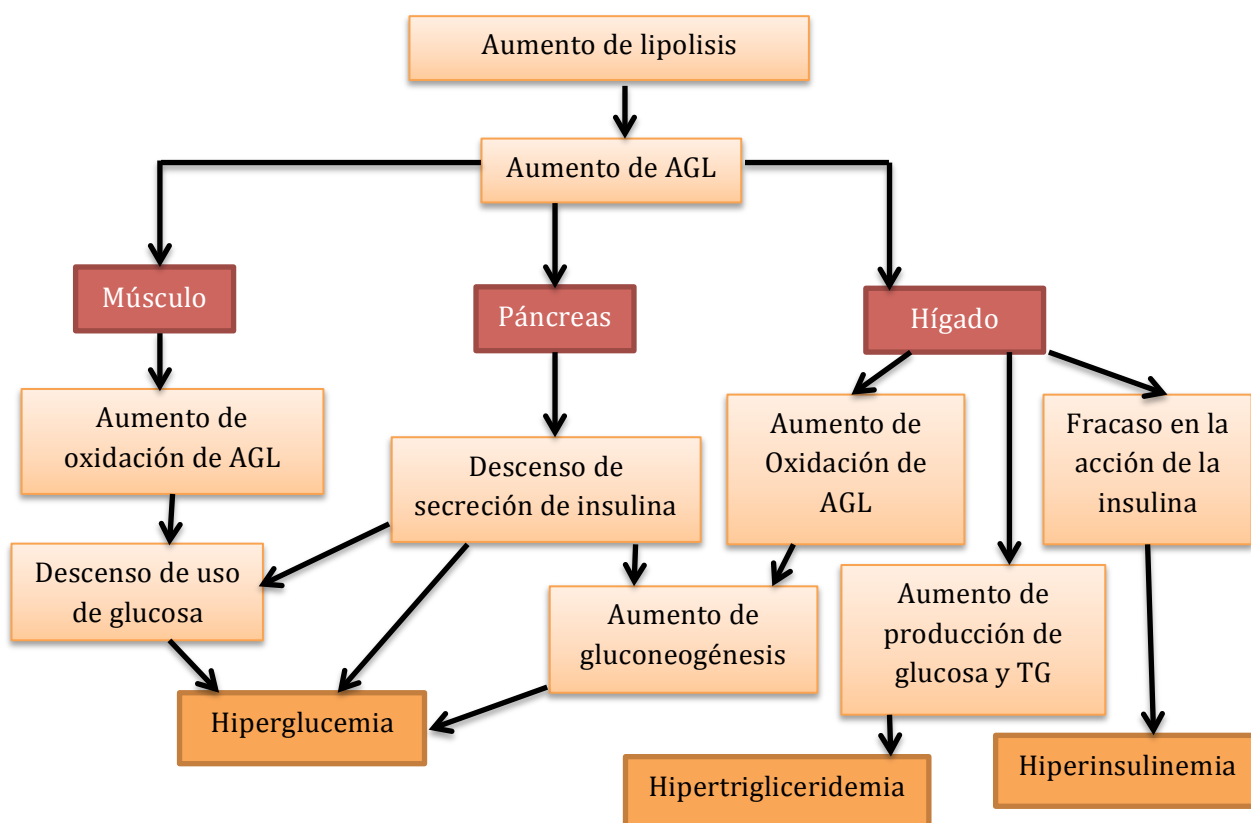


Figura 5.- Efectos adversos del incremento de lipólisis y de la movilización de AGL.
Adaptado de Ibrahim *et al.*⁴⁰

Cuando el TASC claudica en su capacidad de almacenamiento de AGL y TG, estos se depositan de forma anómala en tejidos ectópicos, lo que da lugar a alteraciones metabólicas (figura 6) ⁴⁰.

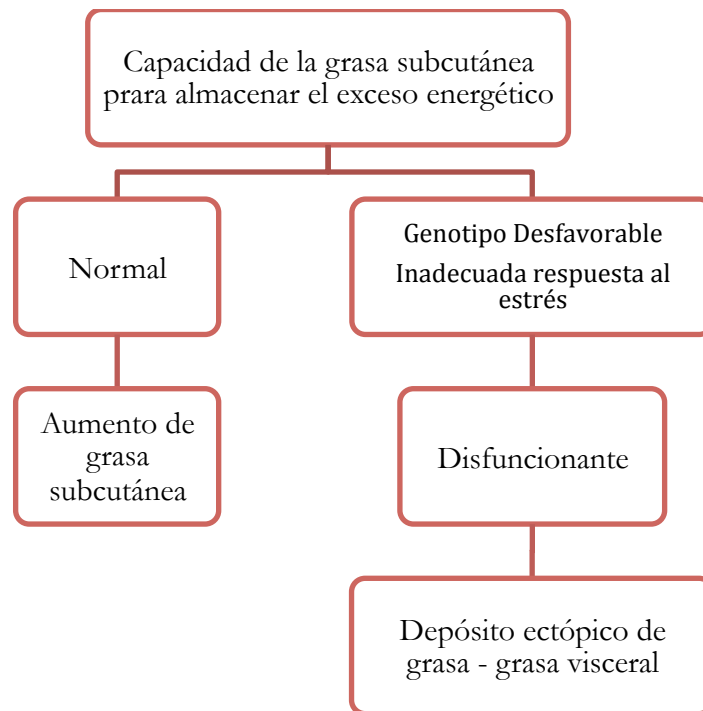


Figura 6.- Capacidad de almacenamiento del exceso energético de la grasa subcutánea. Adaptado de Ibrahim *et al.*⁴⁰

2.2.5. Características clínicas y pronósticas

2.2.5.1. Riesgos metabólicos

El acúmulo de grasa visceral se asocia con una mayor tendencia a la hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, intolerancia a la glucosa, aumento de las lipoproteínas ricas en apolipoproteína B (ApoB), que son características del síndrome de resistencia a la insulina. El aumento del riesgo de desarrollar diabetes es mayor en individuos con exceso de TAV^{97,101,103}. Los individuos con mayor TAV tienen mayor colesterol plasmático y niveles de TG y menor nivel en los valores de colesterol con lipoproteínas de alta densidad¹⁰⁴.

2.2.5.2. Síndrome metabólico

El síndrome metabólico constituye un conjunto de factores de riesgo para enfermedad cardiovascular y DM2 que incluyen aumento de la presión arterial, dislipemia (aumento de TG y disminución del c-HDL, aumento de la glucosa en ayunas y obesidad central). Diversas organizaciones han propuesto varios criterios diagnósticos en los últimos años, a destacar la IDF y la American Heart Association (AHA). La principal diferencia se refiere a la medida de la obesidad central, que era un componente obligatorio en la definición de la IDF, siendo inferior a la de los criterios de la AHA y diferente según etnia. Tras consensos posteriores entre asociaciones se acordó que no debería haber un componente obligatorio, pero que la medición de la cintura seguiría siendo una herramienta útil de evaluación preliminar¹⁰⁵.

La obesidad visceral, la hiperinsulinemia y la IR, no sólo acompañan sino que anteceden a los componentes del síndrome metabólico^{101,106}. La hipertensión arterial, que es uno de los componentes del síndrome metabólico, se explica por la IR y la hiperinsulinemia compensatoria presente en individuos con obesidad visceral^{107,108,109}. La obesidad central puede inducir el desarrollo de la hipertensión arterial mediante el aumento de la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la activación simpática y otros mecanismos estrechamente relacionados con la resistencia a la insulina.

2.2.5.3. Riesgo vascular y eventos cardiovasculares

La grasa visceral cuantificada como el perímetro de cintura, se ha descrito como un factor de riesgo independiente para enfermedad cardiovascular, hipertensión y accidente cerebrovascular¹¹⁰. El exceso de TAV tiene potencial para causar hipercoagulabilidad por el aumento en la secreción de PAI-1. Un perímetro abdominal aumentado, cuando se acompaña de un aumento de TG, da lugar a un mayor riesgo de enfermedad coronaria^{111,112}. La obesidad abdominal se correlaciona estrechamente con otras medidas de la

aterosclerosis como el grosor de la íntima-media vascular¹¹³. La enfermedad arterial periférica también se ha correlacionado con el TAV, pero no con el total de grasa corporal en sujetos de edad avanzada¹¹⁴.

Por otro lado, los sujetos con obesidad abdominal tienen un mayor riesgo de tener una tasa de excreción de albúmina anormal¹¹⁵. Esta microalbuminuria supone un aumento del riesgo cardiovascular. La hiperinsulinemia asociada a la obesidad visceral es un predictor de la enfermedad arterial coronaria¹¹⁶.

El aumento de los AGL circulantes en la obesidad abdominal se asocia con un aumento del riesgo cardiovascular ya que promueve la disfunción endotelial¹⁰⁸.

En la evaluación del riesgo cardiovascular en pacientes obesos, la medición del peso corporal puede ser engañosa¹¹⁷. Sólo los individuos obesos que tienen un aumento del TAV presentan las complicaciones que predicen el desarrollo de DM2 y enfermedad cardiovascular¹⁰⁹. Generalmente, las mujeres presentan un perfil de riesgo más favorable que los hombres, y en general el nivel de TAV es inferior al de los varones. Al ajustar por nivel grasa visceral en hombres y mujeres, se eliminan la mayor parte de las diferencias de sexo en los factores de riesgo cardiovascular¹¹⁸. La distribución de la grasa periférica o glúteo-femoral parece tener un efecto protector contra la aterosclerosis^{119,120}.

2.2.5.4. Predicción de mortalidad

La obesidad se asocia con un aumento de mortalidad por enfermedad cardiovascular¹²¹. Las tasas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares están directamente relacionadas con el IMC, tanto en hombres como en mujeres. La obesidad en la edad adulta también se asocia con una reducción notable en la esperanza de vida¹²². La adiposidad abdominal, medida por el perímetro de cintura, es un predictor significativo de mortalidad

independientemente del IMC¹²³. La grasa visceral es un fuerte predictor independiente de mortalidad por todas las causas¹²⁴.

2.2.5.5. Efectos de la pérdida de peso

El TAV es más sensible que el TASC a la reducción de peso (en cuanto a porcentaje). Todas las formas de pérdida de peso afectan a la grasa visceral más que a la grasa subcutánea¹²⁵.

La obesidad es un estado inflamatorio crónico de bajo grado que se asocia con un aumento de los niveles plasmáticos de marcadores inflamatorios como la PCR. Un estudio demostró que la reducción de peso se asocia con disminución en el nivel de PCR: por cada kilogramo de pérdida de peso, los niveles de PCR disminuyeron 0,13 mg/L¹²⁶. Otras adipoquinas también cambian con la pérdida de peso, como es el caso de la adiponectina, cuyas concentraciones plasmáticas aumentan con la reducción de peso en individuos con obesidad mórbida¹²⁷.

3. Inflamación

Los sistemas metabólicos e inmunológicos son dos de los requerimientos más importantes para la supervivencia. Éstos se han conservado a lo largo de la evolución encontrándose vinculados, de manera que una correcta homeostasis de uno de ellos repercute en el otro. La disfunción en alguna de estas rutas puede desencadenar el desarrollo de patologías metabólicas crónicas como son la obesidad, la DM2 así como enfermedades cardiovasculares. En la obesidad existe una inflamación crónica de bajo grado o metainflamación¹²⁸, en la que hay una activación crónica de la respuesta inmune innata⁶. Estudios experimentales en animales y estudios longitudinales prospectivos en humanos han demostrado que la inflamación subclínica del tejido adiposo juega un papel etiológico en la patogénesis de la DM2. Sin embargo, el mecanismo molecular que regula la activación del sistema inmune innato y la disfunción en la señalización de la insulina en

tejidos periféricos están aún por clarificar. En base a estas premisas, muchas de las investigaciones actuales en el tratamiento de este grupo de trastornos van enfocados a la resolución de esta metainflamación.

En este proceso inflamatorio asociado a la obesidad se sabe que existe una mayor infiltración de MTAs. Estos son la fuente principal de mediadores inflamatorios como el $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 que alteran la función de los adipocitos mediante la inhibición de la acción de la insulina.

Dentro de los MTAs, que constituyen el 10% del total de las células inflamatorias que infiltran el tejido adiposo⁸⁷, la gran mayoría corresponde a un fenotipo M2, es decir, macrófagos activados alternativamente que secretan factores antiinflamatorios¹²⁹, mientras que los macrófagos M1, productores de sustancias pro-inflamatorias, se encuentran en menor medida.

Se ha visto que en las personas con obesidad severa y en los pacientes con DM2, el acúmulo y la activación de macrófagos en el tejido adiposo está implicado en el desarrollo de complicaciones asociadas a la obesidad, incluyendo resistencia a la insulina¹³⁰. Los MTAs, tal como se ha evaluado por inmunohistoquímica y por la expresión de genes específicos de macrófagos (CD68, CD11b - ITGAM -, y factor estimulador de colonias R 1 – CSF R1 -), se correlacionan con el porcentaje de grasa corporal y con la edad. La expresión en el tejido adiposo de PAI-1 y CD11, marcadores producidos por los macrófagos, se correlaciona negativamente con la tasa de eliminación de glucosa¹³⁰. Sin embargo, el PAI-1 y la expresión de CD11c (ITGAX) son predictores independientes de la acción de la insulina, lo que indica un posible papel para la activación de los MTAs¹³⁰.

Cuando en el sobrepeso y la obesidad hay un hipertrofia de los adipocitos, se desencadenan una serie de reacciones que dan lugar a la inflamación del tejido adiposo. Durante la hipertrofia adipocitaria se produce una alteración de su homeostasis, con un incremento en la secreción de adipocinas pro-inflamatorias^{129,131}, sobre todo IL-6 y $\text{TNF}\alpha$, descendiendo

los niveles de adiponectina. El crecimiento desproporcionado de estas células genera zonas de hipoxia en el tejido adiposo que origina la liberación de adipoquinas pro-inflamatorias así como la polarización de MTAs M2 residentes en el tejido adiposo a macrófagos M1 productores de adipoquinas inflamatorias. Por este proceso se genera una muerte celular de los adipocitos más periféricos que de la misma forma incrementa la reacción inflamatoria. En respuesta a esta hipoxia tisular se activa el NF- κ B, que estimula la producción de MCP-1 o CCL2, que produce infiltración masiva de macrófagos M1 en tejido adiposo^{132 133}. CCL2 es un ligando de alta afinidad por el receptor-2 de quimioquinas C-C (CCR2). Éste regula el reclutamiento de monocitos y de macrófagos y es necesario para la respuesta inflamatoria macrófago-dependiente y el desarrollo de la aterosclerosis¹³⁴. Se ha visto que el déficit genético de *Ccr2* reduce la ingesta de alimentos y atenúa el desarrollo de la obesidad en ratones alimentados con una dieta alta en grasas. En ratones obesos, el déficit de *Ccr2* reduce el contenido de macrófagos y el perfil inflamatorio del tejido adiposo, incrementa la expresión de adiponectina, disminuye la esteatosis hepática y mejora la homeostasis de la glucosa y la IR. En ratones obesos, el tratamiento a corto plazo con antagonistas de CCR2 disminuye el contenido de macrófagos en el tejido adiposo y mejora la IR. Estos datos sugieren que el CCR2 influye también en el desarrollo de obesidad asociada a inflamación del tejido adiposo e IR sistémica y juega un papel clave en el mantenimiento de los macrófagos y la IR una vez que la obesidad y sus consecuencias metabólicas se han establecido¹³⁴. Del mismo modo, la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1 α o CCL3), miembro también de la superfamilia C-C, tiene un papel quimioatrayente de monocitos¹³⁵. Ambas son segregadas por macrófagos y por preadipocitos, facilitando la infiltración de MTAs¹³⁶.

Todos los mecanismos patológicos previos actúan de forma sinérgica incrementando la proporción de macrófagos que pasa de un 10% a un 40% de las células presentes¹³⁷, con un predominio de M1 respecto M2^{87,131}. Es por esto que los mecanismos implicados en el reclutamiento de los MTAs, su

polarización hacia M1 y por tanto la disfunción en su regulación, son objetivo prioritario de los estudios actuales, ya que el conocimiento de estos elementos puede suponer un plus en el tratamiento y prevención de los eventos metabólicos y cardiovasculares secundarios¹³⁸. En la figura 7 se resume los mecanismos que intervienen en el proceso inflamatorio del tejido adiposo.

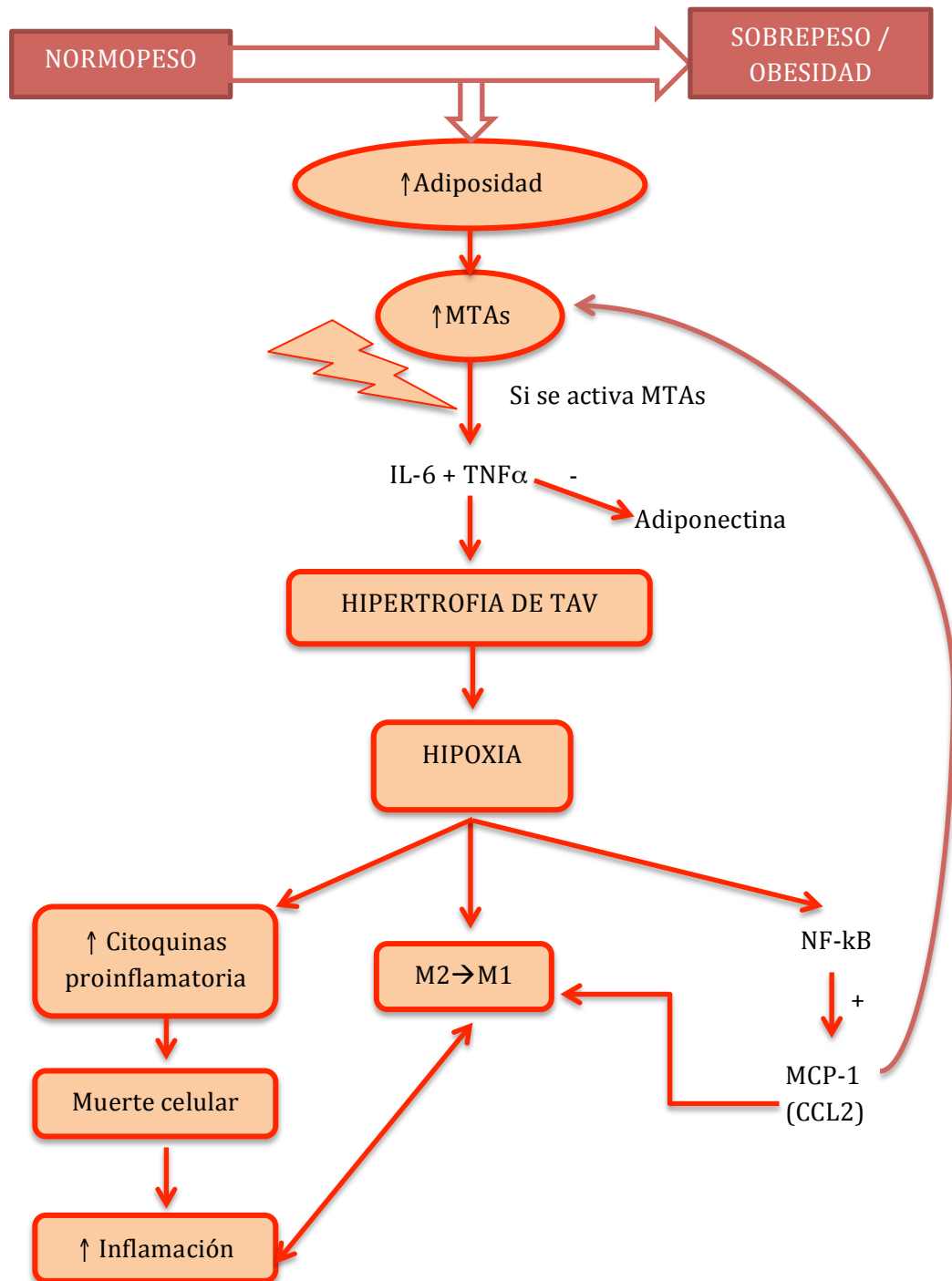


Figura 7.- Mecanismos que intervienen en el proceso inflamatorio del tejido adiposo.

4. Adipogénesis

Cuando existe un balance positivo de energía, ya sea por aumento de la ingesta, por disminución del gasto o por ambas cosas como es en el caso del sobrepeso y la obesidad, se produce la hipertrofia del tejido adiposo. El lugar de depósito fisiológico para el excedente energético es el tejido adiposo subcutáneo. Este aumento de tejido adiposo se puede dar por:

- Hiperplasia (adipogénesis): generación de nuevos adipocitos a partir de los pre-adipocitos.
- Hipertrofia: aumento en el tamaño de los adipocitos por el aumento del depósito de TG.

La hipertrofia adipocitaria, a diferencia de la hiperplasia que sólo implica almacenamiento del excedente energético, conlleva a la alteración de las funciones del tejido adiposo, con una desregulación en la síntesis de adipoquinas, lo que da lugar a alteraciones metabólicas y al inicio de una respuesta inflamatoria¹³⁹.

4.1. Expansibilidad del tejido adiposo

Más allá de la capacidad de expansión del tejido adiposo, los cambios patológicos esenciales del tejido adiposo afectan a toda la homeostasis energética y a la integridad corporal.

4.1.1. Capacidad neogénica del tejido adiposo

El tejido adiposo es muy dinámico; hasta un 10% de las células adiposas mueren y se renuevan cada año¹⁴⁰. El exceso de lípidos en el tejido adiposo produce una hipertrofia y/o una hiperplasia, reflejándose en un aumento del TASC y TAV¹⁴¹ (Figura 8).

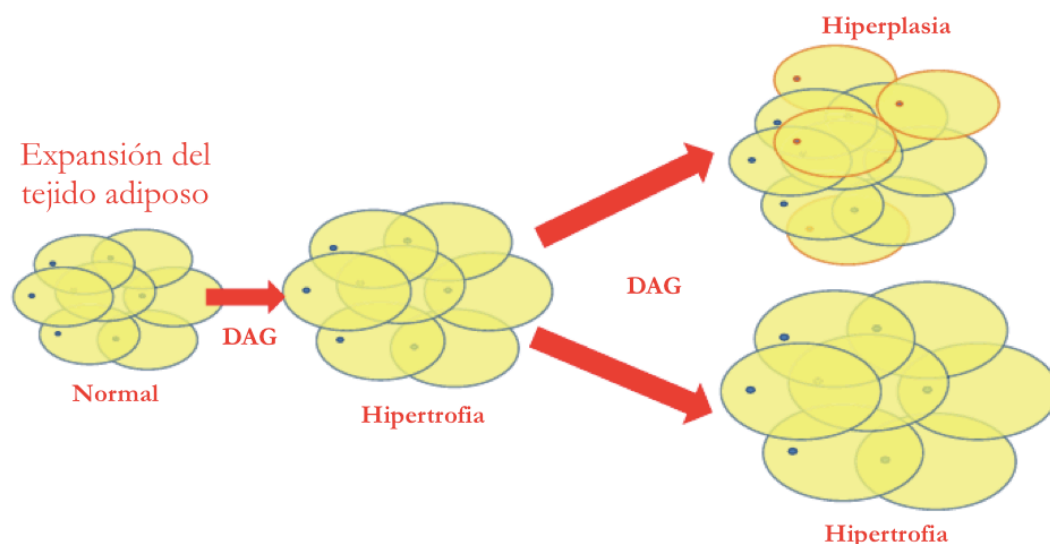


Figura 8.- La expansión del tejido adiposo se produce a través de la hipertrofia inicialmente. Si el excedente de energía continúa, la expansión del tejido adiposo se producirá a través de la hiperplasia y/o hipertrofia. En estos mecanismos intervienen diferentes procesos: adipogénesis, apoptosis, y/o angiogénesis, lo que determinará el estado metabólico del paciente. Además este tejido adiposo se puede modular dentro de cada mecanismo. DAG: dieta alta en grasas.

Las diferencias metabólicas y funcionales entre los depósitos de tejido adiposo van a marcar su disfuncionalidad. Así, el TAV tiene una mayor capacidad para generar AGL y para la captación de glucosa, mientras que el TASC es más ávido en la absorción de AGL circulantes y TG⁴⁰.

Por otro lado, se ha observado un impacto diferente del tamaño de las células de la grasa subcutánea y visceral en cuanto a lípidos y perfiles de glucosa/insulina¹⁴². De tal manera que el tamaño medio de las células grasas se asocia con complicaciones metabólicas, pero no con la inflamación sistémica o adiposa en la obesidad mórbida, existiendo una influencia específica de cada región: las células adiposas viscerales grandes están más fuertemente ligadas a la dislipemia, mientras que las grandes células de grasa subcutánea se correlacionan con la alteración del metabolismo de la glucosa, la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina¹⁴². Así, Veilleux *et al.* sugieren que en el TAV, pero no en el TASC, la hipertrofia de los adipocitos se asocia con un perfil lipídico alterado independiente de la composición corporal y

distribución de la grasa¹⁴³. Estas diferencias pueden ser determinantes en el desarrollo de la obesidad y los trastornos relacionados, siendo la IR el factor más importante en la vinculación entre el TAV y el riesgo cardiovascular⁴⁰; mientras que en estados de baja IR, la expresión de la mayoría de las enzimas en las vías lipogénicas y lipolíticas es mayor en el TASC para facilitar el circuito TG / AGL¹⁴⁴.

Sin embargo, la gran variabilidad interindividual observada en el tamaño de los adipocitos en un determinado nivel de adiposidad sugiere que la tendencia a la hipertrofia de células grasas en cada compartimento de grasa puede variar entre los individuos¹⁴³.

4.1.1.1. Aproximación molecular.

Aunque pueda parecer incongruente, las estrategias para aumentar la capacidad del tejido adiposo para almacenar lípidos y, por lo tanto, hacer que las personas puedan ser más obesas, podrían tener beneficios metabólicos¹⁴⁵.

Permitir que el tejido adiposo almacene más lípidos podría prevenir complicaciones metabólicas secundarias causadas por los lípidos que se depositan en los órganos no adiposos¹⁴⁶. Por lo tanto, la capacidad del tejido adiposo para expandirse y combinar las necesidades de almacenamiento de exceso de energía puede ser un determinante clave en la protección contra el síndrome metabólico asociado con la obesidad¹⁴⁷. Por eso es muy importante comprender los factores de señalización que controlan la expansión del tejido adiposo.

Dentro de ellos, se sabe que la familia Wnt controla la diferenciación de los adipocitos, y se ha demostrado que varios miembros de esta familia inhiben los primeros pasos de la adipogénesis¹⁴⁸. Por el contrario, se demostró que los inhibidores de señal de Wnt promovían la generación de adipocitos¹⁴⁹.

Un grupo de estos antagonistas de Wnt extracelular son las proteínas secretadas relacionadas con frizzled (SFRPs, también conocidas como proteínas relacionadas con la apoptosis o SARP)¹⁵⁰; se han identificado al menos cinco SFRPs estructuralmente similares. En la obesidad, se ha observado que los niveles de expresión de SFRP1-4, pero no de SFRP5, están alterados; se ha observado que la SFRP1, SFRP2 y SFRP4 son adipoquinas y sus expresiones se correlacionaron con la sensibilidad a la insulina¹⁵¹. Sin embargo se ha confirmado que, en el contexto de la obesidad, la secreción de SFRP5 por los adipocitos ejerce efectos saludables en la disfunción metabólica mediante el control de las células inflamatorias en el tejido adiposo¹⁵². Por otra parte, la evidencia es limitada para apoyar el papel de la SFRP1 endógena en el desarrollo fisiológico y/o patológico de la obesidad humana y el síndrome metabólico. De acuerdo con ello, Lagathu *et al.* sugieren un modelo de expansión del tejido adiposo que se caracteriza por la regulación positiva de SFRP1 en las primeras etapas de la obesidad¹⁵³. Esta elevación de SFRP1 podría inhibir la señalización de Wnt y, por lo tanto, facilitar la expansión del tejido adiposo, asegurando que se cumpla la demanda de almacenamiento de nutrientes. Otros resultados de ganancia de peso en los niveles de SFRP1 muestran de nuevo los mismos valores que en los sujetos con normopeso, y limitan la adipogénesis mediante el aumento de la señalización de Wnt / β -catenina, comprometiendo aún más la expansión del tejido adiposo (Figura 9)¹⁵⁴.

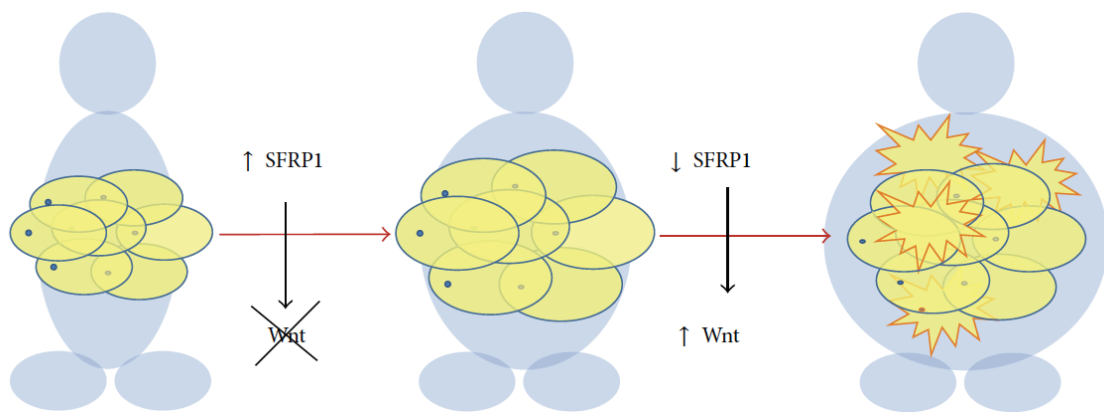


Figura 9.- Alteración en SFRP1 y Wnt en el desarrollo de la obesidad

De entre otras moléculas a destacar en la adipogénesis, la proteína de unión al enhancer CCAAT alfa (CEBP α) es un factor de transcripción que juega un papel importante en la diferenciación adipocitaria¹⁵⁵. Su papel es crítico en la adipogénesis junto con el receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisoma (PPAR γ), molécula central de la adipogénesis. El PPAR γ puede promover la adipogénesis en células deficientes en CEBP α , pero no se ha probado lo contrario. Sin embargo, CEBP α mantiene la expresión de adipocitos en desarrollo y es crítica en la generación de la sensibilidad a la insulina. Participan ambos en una sola vía de desarrollo de células grasas siendo PPAR γ el efector proximal de la adipogénesis¹⁵⁶.

La proteína relacionada con la diferenciación adiposa (ADRP) juega un papel importante en la regulación del almacenamiento de lípidos, de manera que su expresión aumenta a medida que avanza la diferenciación adipocitaria por la expansión de las reservas lipídicas y el aumento de los TG celulares¹⁵⁷.

La lipoproteínlipasa (LPL) es un marcador clave en la diferenciación adipocitaria, de manera que su expresión se incrementa en paralelo tanto con el acúmulo de TG celulares como con la diferenciación de preadipocitos. Aunque el tejido adiposo puede sintetizar AGL *de novo*, los AGL para el almacenamiento de lípidos son proporcionados preferentemente por hidrólisis mediada por LPL de lipoproteínas ricas en TG plasmáticos, situando a la LPL en un puesto relevante en el inicio y / o desarrollo de la obesidad¹⁵⁸.

La gran revolución en el estudio del tejido adiposo, sin embargo, ha sido el aislamiento y caracterización de una población de células madre multipotentes derivadas de tejido adiposo (hO-MSCs)¹⁵⁹. Esto ha abierto nuevas posibilidades, especialmente en relación con el estudio de cómo esta población de células madre multipotentes residente en el tejido adiposo se ve afectada por, o contribuye a, la disfunción del tejido¹⁵⁹. Algunos trabajos sugieren que la disminución en el RNA mensajero (mRNA) de genes adipogénicos y el potencial clonogénico, así como la acumulación de proteínas

fibróticas con alteraciones metabólicas, podrían ser mecanismos relevantes que controlan el número y tamaño de los adipocitos neogenerados y que participan en la alteración de la expansión del tejido adiposo¹⁶⁰. Es importante evaluar la influencia del medio ambiente adipogénico.

Varios estudios se han centrado en la alteración de la diferenciación de preadipocitos en la obesidad. Isakson *et al.* observaron que los preadipocitos de los individuos obesos presentaban un menor potencial de correlación adipogénica con el IMC elevado¹⁶¹, mientras que Cleveland-Donovan *et al.* observaron alteraciones en la capacidad proliferativa por una alteración en la activación del ciclo celular¹⁶².

De acuerdo con estas observaciones, se ha demostrado una asociación entre la obesidad y la pérdida de troncalidad en la población hO-MSC, caracterizada por una alteración en el potencial de diferenciación multilinaje en la red de regulación de las células madre. Las hO-MSCs de los sujetos obesos tienen mayor senescencia y esta senescencia se incrementa paralelamente al grado de incremento de la obesidad. Por tanto, los sujetos obesos tienen una capacidad de diferenciación inferior de su hO-MSC hacia tejido adiposo y tejido óseo¹⁶³. Hay varias vías moleculares que pueden explicar la respuesta refractaria en la diferenciación de hO-MSCs de los pacientes con obesidad mórbida.

4.1.2. Capacidad apoptótica del tejido adiposo

La apoptosis es un mecanismo fundamental para la homeostasis de los tejidos de los mamíferos y se ha relacionado con gran variedad de trastornos. Se ha propuesto que la desregulación de este proceso pueda contribuir a la obesidad, a las diferencias en la distribución de grasa regional o a la lipodistrofia¹⁶⁴. Recientemente se ha encontrado una relación entre la inflamación del tejido adiposo y la apoptosis^{165,166}, aunque la apoptosis del

tejido adiposo es un fenómeno relativamente poco estudiado. En la apoptosis participan moléculas proapoptóticas y antiapoptóticas para asegurar la homeostasis de los tejidos. La modulación de la apoptosis se está posicionando como una estrategia prometedora contra la obesidad ya que en ella se produce la eliminación de los adipocitos lo que daría lugar a la reducción de la grasa corporal¹⁶⁷. En la figura 10 se resume el mecanismo que da lugar a la apoptosis del tejido adiposo

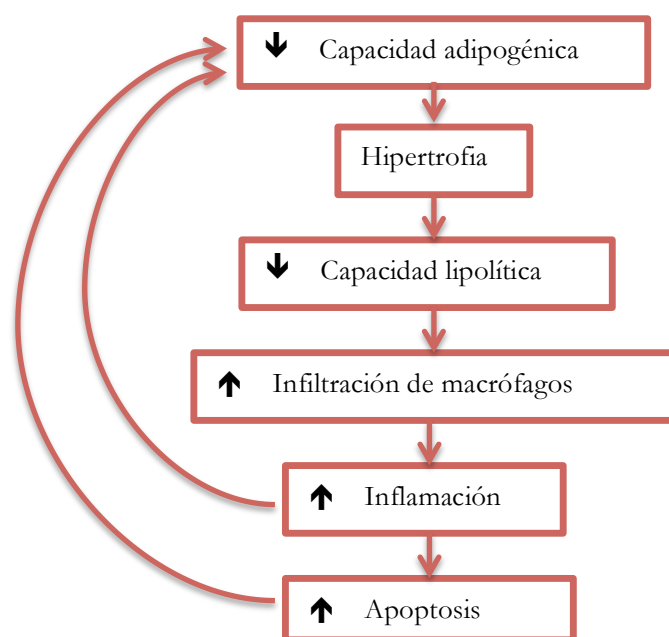


Figura 10.- Mecanismos que dan lugar a la apoptosis. Adaptado de Keuper *et al.*¹⁶⁶

La disminución de la capacidad adipogénica del tejido adiposo produce la hipertrofia de los adipocitos con una disminución de la capacidad lipolítica. Esta reducción de la capacidad lipolítica conlleva a un aumento de la infiltración de macrófagos, lo que provoca inflamación, que disminuye la capacidad adipogénica aún más y da lugar a la apoptosis, que a su vez disminuye la capacidad adipogénica del tejido adiposo¹⁶⁶.

Dos de las principales familias implicadas en la apoptosis son las caspasas y la proteína 2 del linfoma de células B (BCL2). Recientemente se ha encontrado un aumento en la expresión de genes del CASP3/7 proapoptótico

y una disminución en la expresión del gen BCL2 antiapoptótico en el tejido adiposo (ambos en TAV y TASC) con el aumento de la masa grasa corporal¹⁶⁸.

Por otra parte, los estudios *in vitro* han demostrado que el cultivo con factores proinflamatorios de los adipocitos aumentan la ruta apoptótica. Estos fenómenos podrían ser consecuencia de la inflamación inducida por la obesidad; así, estos resultados se asocian con un estado de IR, ya que estos cambios van acompañados de un aumento en la expresión génica de citoquinas inflamatorias (TNF α e IL-6) y de marcadores de infiltración de macrófagos¹⁶⁸.

Se han asociado muchos marcadores con la apoptosis, principalmente a través de la inflamación. Una citoquina multifuncional proapoptótica que pertenece a la superfamilia del TNF, llamada inductor débil de la apoptosis similar a TNF (TWEAK), controla muchas acciones celulares y ha surgido como un nuevo participante en el proceso inflamatorio. TWEAK (y su receptor Fn14) está regulado positivamente en la obesidad severa, debido a la modulación del microambiente generado por los macrófagos infiltrados¹⁶⁹, pero no por la hipoxia¹⁷⁰. Una disminución en la forma soluble de TWEAK en pacientes con obesidad severa puede favorecer la actividad proinflamatoria de TNF α ¹⁷¹. Los últimos estudios han demostrado que el ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) aminora la historia natural de la DM2, ya que produce una reducción significativa de citoquinas proinflamatorias, asociándose los cambios inducidos con una modulación de la expresión génica del tejido adiposo y la apoptosis¹⁷². Así, los niveles circulantes de TRAIL pueden indicar la gravedad de la DM2; los niveles circulantes bajos pueden preceder a la aparición de la DM2, mientras que los niveles más altos de TRAIL soluble pueden indicar una DM2 crónica¹⁷³. Por otra parte, mediante la unión a TRAIL-R2, TRAIL activa la escisión de la

caspara-8 y la caspara-3, lo que a su vez escinde e inactiva al PPAR γ . Esto provoca cambios en la expresión génica de los genes lipogénicos, como del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4), la sintasa de ácidos grasos (FASN) y la acetil CoA carboxilasa (ACC), y, finalmente, conduce a la inhibición de la captación de glucosa y la lipogénesis estimuladas por la insulina¹⁷⁴. Esta reducción de PPAR γ también reduce la diferenciación del adipocito¹⁷⁴.

Por otro lado, la mer tirosin quinasa (MerTK)¹⁷⁵ es un receptor de la apoptosis celular de los macrófagos. El deterioro en su función promueve la autoinmunidad y la aterosclerosis, mientras que su sobreexpresión se correlaciona con mal pronóstico en el cáncer. Sin embargo, se sabe poco acerca de los mecanismos que regulan la expresión de MerTK en los seres humanos. Se ha encontrado que la expresión MerTK es heterogénea entre los subconjuntos de macrófagos, siendo mayormente restringida a un subconjunto de células antiinflamatorias M2c (CD14 + / CD16 + / CD163 + / CD204 + / CD206 + / CD209), diferenciados por el M-CSF o por glucocorticoides. Los niveles de expresión de MerTK se adaptan a los cambios en el entorno inmunológico, estando suprimida en los macrófagos M1 y M2a y en las células dendríticas. Sorprendentemente, a pesar de que la diferenciación inducida por los glucocorticoides es independiente de la IL-10, M-CSF conduce a la polarización M2c y se relaciona con la regulación positiva de MerTK requerida por la IL-10. Sin embargo, ni la IL-10 sola ni el TGF- β son suficientes para diferenciar totalmente a macrófagos M2c (CD16 + CD163 + MerTK +). MerTK permite que los macrófagos M2c eliminen precozmente la célula apoptótica de forma más eficiente que otro subconjunto de macrófagos, y es mediador para la eliminación de células apoptóticas por los CD14^{bright}CD16⁺¹⁷⁵.

Por otra parte, las células M2c liberan Gas6, que a su vez amplifica la secreción de IL-10 a través de MerTK. La inducción de la vía Gas6/MerTK

dependiente de IL-10, contribuye a un bucle positivo para la homeostasis de los macrófagos M2c, siendo un punto de control crítico para el mantenimiento de las condiciones anti-inflamatorias.

4.1.3. Angiogénesis del tejido adiposo

La expansión del tejido adiposo debe ir acompañada de su vascularización, a través de procesos de angiogénesis, mientras que la pérdida de peso se asocia con la regresión de los vasos sanguíneos. El tejido adiposo está altamente vascularizado, y cada uno de los adipocitos se nutre de una extensa red capilar, por lo que el desarrollo y mantenimiento de los depósitos de grasa requieren de la angiogénesis. El tejido adiposo es, pues, uno de los tejidos con mayor capacidad angiogénica³⁶. Por lo tanto, la expansión del tejido adiposo está vinculado con el desarrollo de su vasculatura¹⁷⁶.

La irrigación adiposa aporta nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento, hormonas y citoquinas al tejido adiposo, con lo que las células progenitoras circulantes son capaces de diferenciarse a preadipocitos y células endoteliales vasculares¹⁷⁷. Los vasos también favorecen la infiltración de numerosas células inflamatorias y eliminan los productos de desecho¹⁷⁸. Además, las células endoteliales activadas producen varios factores de crecimiento y citoquinas, y los vasos fenestrados juegan un papel esencial en los efectos locales o sistémicos de adipoquinas³⁸.

Durante el desarrollo embrionario, tanto la diferenciación arteriolar como la diferenciación de los vasos sanguíneos de la matriz extracelular preceden a la diferenciación de los adipocitos¹⁷⁹. Sin embargo, durante el desarrollo posterior del tejido adiposo, a lo largo de toda la vida, parece que los adipocitos por sí solos impulsan el desarrollo y el mantenimiento de sus vasos sanguíneos¹⁷⁹.

Los factores de crecimiento que están involucrados en los procesos de angiogénesis y la regresión vascular podrían ser una diana potencial para el tratamiento de la obesidad. La hipótesis de que la inflamación del tejido adiposo y la resistencia a la insulina pueden estar relacionados con la alteración en la angiogénesis del tejido adiposo se presentan así como el efecto beneficioso o perjudicial de la inhibición de la angiogénesis en el tejido adiposo en las enfermedades metabólicas³⁶.

Sin embargo, en la hipertrofia, el aumento de la vascularización no sucede en paralelo. Se ha descrito que las anomalías de la angiogénesis pueden contribuir a la patogénesis de las complicaciones de la DM2. El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y sus receptores desempeñan un papel crucial tanto en la angiogénesis como en la vasculogénesis. También se ha descrito el VEGF como un potente estimulador de la proliferación y migración endotelial¹⁸⁰; además de que es necesaria su señalización para una función adecuada del tejido adiposo¹⁸¹.

En la tabla 5 se resumen los factores de crecimiento de endotelio vascular y su función en el tejido adiposo.

Ligandos VEGF	VEGF-A, VEGF-B	VEGF-A, VEGF-E	VEGF-C, VEGF-D
Receptores VEGF	VEGF-R1	VEGF-R2	VEGF-R3
Expresión VEGF-R	Monocitos, macrófagos, endotelio vascular	Endotelio vascular y linfático	Endotelio linfático
Efecto fisiológico	<ul style="list-style-type: none"> - Vasculogénesis - Angiogénesis - Migración de monocitos y macrófagos - Regulador de señal de VEGF-R2 	<ul style="list-style-type: none"> Vasculogénesis Angiogénesis 	Linfoangiogénesis

Tabla 5.- Funciones de los factores de crecimiento vascular en el tejido adiposo. Adaptado de Wang *et al.*¹⁸⁰. VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular. VEGF-R: receptor del factor de crecimiento de endotelio vascular.

5. Lipogénesis

La acumulación de grasa viene determinada por el equilibrio entre la síntesis de grasa (lipogénesis) y su descomposición (lipólisis / oxidación de los ácidos grasos). La lipogénesis abarca los procesos de síntesis de ácidos grasos y la síntesis de TG, y tiene lugar en el hígado y en el tejido adiposo. Si bien lo universalmente aceptado es que la función principal de los adipocitos es de almacenaje, el tejido adiposo también es un sitio importante en la síntesis endógena de ácidos grasos, aunque la lipogénesis en este tejido se considera baja y menor que en el hígado¹⁸².

La lipogénesis hepática excesiva es una característica distintiva de muchos modelos de obesidad y diabetes, aunque la relación causal entre la acumulación de lípidos del tejido y resistencia a la insulina no está clara¹⁸³. Algunas de las razones más factibles son su relación con el hígado graso no alcohólico¹⁸⁴, la respuesta al estrés del retículo endoplasmático (RE)¹⁸⁵, el papel de los AGL¹⁸⁶ y/o las ceramidas¹⁸⁷.

Se cree que la lipogénesis contribuye relativamente poco a los depósitos de lípidos de todo el cuerpo en el ser humano de hoy en día, que consume una dieta alta en grasa¹⁸⁸. Sin embargo, en situaciones especiales tales como una dieta rica en hidratos de carbono, la síntesis total de grasa corporal supera significativamente la lipogénesis *de novo*¹⁸⁹. La capacidad de almacenamiento del tejido adiposo para los ácidos grasos impide la lipotoxicidad en otros tejidos¹⁹⁰. Sin embargo, la regulación del almacenamiento del tejido adiposo se altera en la obesidad debido al déficit en la capacidad del tejido adiposo para responder rápidamente. Por lo tanto, se ha sugerido que la vía lipogénica está inhibida en la obesidad, al menos a nivel de expresión génica¹⁹¹. Aunque en la obesidad temprana hay un aumento en la expresión génica lipogénica con el fin de almacenar grasa rápidamente, en sujetos con obesidad de larga duración

esta expresión disminuye, tal vez debido a un proceso de adaptación tardío, con la finalidad de limitar aún más el desarrollo de masa grasa¹⁹². Una explicación posible para esta inversión es que una vez que se alcanza la capacidad de almacenamiento de los adipocitos, las células reducen su capacidad de sintetizar ácidos grasos adicionales, seguido de un proceso de retroalimentación negativa¹⁹¹.

Los cambios en los procesos y la capacidad de movilización de los lípidos almacenados en los adipocitos representan elementos importantes en la disfunción del tejido adiposo. Hay muchos factores involucrados en esta acción. Los patrones de expresión génica juegan un papel clave en la determinación de la patogénesis de la DM2 y la obesidad^{193,194}.

5.1. Receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas

El PPAR γ es un regulador de la adipogénesis y la lipogénesis, siendo considerado el regulador más importante en estos procesos. La activación de PPAR γ da lugar a la diferenciación de los adipocitos y al almacenamiento de ácidos grasos e inhibe a los genes que inducen la lipólisis y la liberación de AGL en los adipocitos¹⁹⁵. El fracaso en el metabolismo de esta molécula conduce a la desregulación en el almacenamiento y movilización óptima de lípidos, el principal problema de la obesidad¹⁹⁵.

En condiciones normales, la expresión de PPAR γ es más alta en el momento postprandial y su activación conduce a la regulación positiva de genes que median la absorción y captura de ácidos grasos, asegurando el almacenamiento y la relocalización del exceso de TG¹⁹⁶. Por otra parte, PPAR γ tiene un papel directo en el control transcripcional de nodos funcionales específicos del eje lipolítico a través del complejo proteína quinasa A (PKA)¹⁹⁷.

Además, los sujetos con IR y obesidad tienen una expresión reducida de PPAR γ , tanto en ayunas como postprandial^{198,199}.

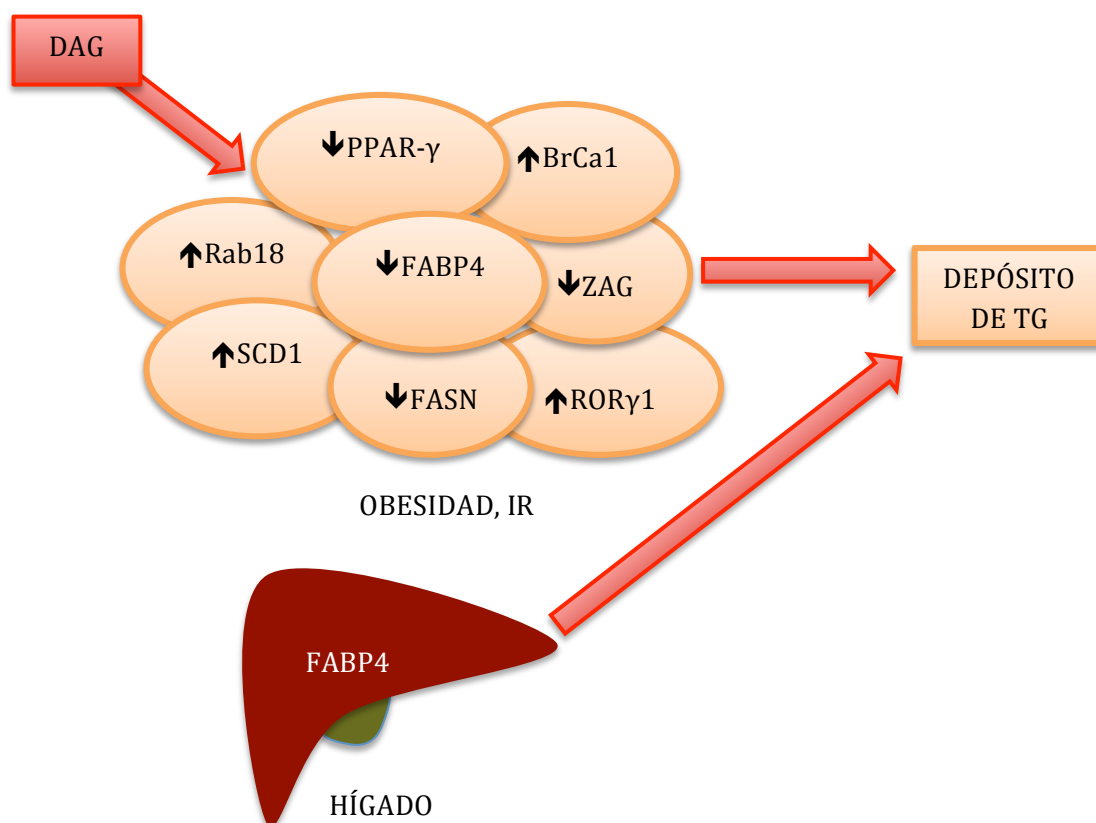
Los pacientes con obesidad mórbida y con DM2 tienen una menor expresión de PPAR γ 2 en comparación con los pacientes con obesidad mórbida sensibles a la insulina, tanto en el TAV como en el músculo¹⁹⁸. Esto está estrechamente relacionado con la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo y muscular y con la falta de correspondencia entre el excedente de energía y la capacidad de almacenamiento en estos tejidos, que posiblemente sean factores de vinculación importantes entre la obesidad y la IR²⁰⁰.

5.2. Proteína transportadora de ácidos grasos 4

Otra forma de abordar la cuestión de la pérdida de capacidad lipogénica en individuos con IR es la compensación de esa pérdida por los tejidos y órganos distintos a los del tejido adiposo. Por ejemplo, la proteína transportadora de ácidos grasos 4 (FABP4), es una proteína relacionada con la sensibilidad a la insulina, el metabolismo de los lípidos y la inflamación²⁰¹, que se ha descrito como un mediador importante en la relación entre los adipocitos y macrófagos en el tejido adiposo. Se ha sugerido que el tejido adiposo y el hígado pueden actuar de una manera equilibrada dependiendo del estado de IR, siendo FABP4 un factor clave en esta función²⁰².

5.3. Otros factores clave implicados en la lipogénesis del tejido adiposo

En la figura 11 y tabla 6 se presenta un resumen de distintos factores implicados en la lipogénesis del tejido adiposo además de los ya descritos previamente.



Gen	Actividad
PPAR-γ	Regulador de adipogénesis y lipogénesis
FASN	Encima clave en la lipogénesis
ZAG	Control del peso corporal a través de la movilización de lípidos
FABP4	Relacionada con la sensibilidad a la insulina, el metabolismo lipídico y la inflamación
RORγ1	Modula la captación de glucosa y promueve la adipogénesis
SCD1	Convierte los ácidos grasos saturados en ácidos grasos monoinsaturados
Rab18	Regula el flujo de lípidos a través de membrana
BrCa1	Ayuda al mantenimiento de la biosíntesis de ácidos grasos y la lipogénesis

Figura 11 y tabla 6.- Vía de la lipogénesis en pacientes obesos. La pérdida de la capacidad lipogénica del tejido adiposo se compensa por otros tejidos y órganos, sobre todo por el hígado. Por tanto, muchas moléculas juegan un papel importante en la pérdida de la capacidad lipogénica del tejido adiposo, actuando por una vía errónea.

DAG: dieta alta en grasas. IR: insulino-resistencia; TG: triglicéridos triacilglicerol; FASN: Sintasa de ácidos grasos; ZAG: Glicoproteína Zinc-α2; RORγ1: Receptor del ácido retinoico relacionado con el receptor nuclear huérfano γ1; SCD1: stearyl-CoA desaturasa-1; Rab18: Proteína 18 relacionada con Ras; BrCa1: cáncer de mama 1.

En resumen, a pesar de la predisposición genética potencial para forzar el destino celular adipogénico mediante la regulación por el incremento de PPAR γ , la combinación de genes desreguladores y de inhibición de la adipogénesis pueden causar un bloqueo, induciendo un fallo de entrada y / o el progreso del destino adipogénico¹⁶³. Así, el hO-MSC de sujetos con obesidad mórbida tiene alterada la capacidad para expandirse y diferenciarse. Esto se refleja en la llamada "hipótesis de expansibilidad del tejido adiposo", donde la expansión patológica del tejido adiposo abdominal en la obesidad mórbida alcanza un umbral caracterizado por la incapacidad del tejido adiposo de expandirse debido a su dificultad para reclutar nuevos adipocitos. Esto se asocia con complicaciones metabólicas e IR debido al depósito ectópico del exceso de lípidos en el tejido no adiposo²⁰³.

6. Fenotipos discordantes

Un paradigma clásico ha sido el hecho de que la mayor cantidad de tejido adiposo implicaba mayor prevalencia de enfermedades metabólicas²⁰⁴, siendo la principal preocupación con respecto a la obesidad el mayor riesgo cardiovascular en estos pacientes.

Sin embargo, actualmente se están incrementando aquellos individuos que no encajan dentro del fenotipo tradicional. Son los llamados fenotipos discordantes, es decir, contradicciones clínicas que son excepciones al paradigma clásico de “a mayor obesidad, mayor enfermedad metabólica”. Hay individuos con obesidad y obesidad mórbida de larga duración que se pueden considerar sanos independientemente de su nivel de obesidad. Este fenómeno se describió hace más 15 años²⁰⁵ y a estos sujetos se les definió como obesos metabólicamente sanos (ObMS). En el otro extremo encontramos aquellos sujetos que, si bien presentan un peso corporal comprendido bajo los estándares de normalidad, se pueden considerar enfermos de acuerdo a su

estado metabólico; son los sujetos con normopeso metabólicamente enfermos (NPME). Si bien el estudio de los ObMS ha despertado un creciente interés en la comunidad científica^{206,207,208}, hay una clara falta de información acerca del otro fenotipo discordante, los NPME. De hecho, estos pacientes están generando una gran controversia acerca de su clasificación metabólica, y por tanto, su riesgo cardiovascular. Pero lo más importante es que los fenotipos discordantes van a ser interesantes para proporcionar conocimientos relevantes sobre la relación mecanicista de las alteraciones metabólicas asociadas²⁰⁹.

Dentro de los fenotipos discordantes, los factores determinantes "sano" vs "no saludable" en el peso normal y la obesidad se encuentran sin definición consensuada. La primera pregunta que debemos hacernos es si realmente existen los fenotipos discordantes, y muy especialmente el ObMS, o es solo una fase previa al desarrollo de la enfermedad metabólica. Y por otro lado, el siguiente estadio será valorar si realmente un paciente sin criterios de enfermedad metabólica podemos definirlo como "sano". Hay mucha controversia en este interrogante dentro de la comunidad científica.

6.1. Enfermedad metabólica

Históricamente, la principal preocupación en relación con la obesidad era el riesgo metabólico y cardiovascular. En los últimos años, ha habido una mayor conciencia de los individuos que no encajan en este fenotipo tradicional. Se han encontrado algunas incongruencias: por ejemplo, algunas personas extremadamente obesas no son diabéticas, mientras que otras personas con sobrepeso desarrollan IR severa y diabetes²¹⁰. Esto sugiere que la cantidad absoluta de grasa almacenada no puede ser el factor de mayor relevancia que determina la relación entre la obesidad y la diabetes. Por lo tanto, las consecuencias adversas para la salud relacionadas con la obesidad

parecen estar relacionadas con la distribución de la grasa más que con su cantidad²¹¹.

Los clínicos han observado durante mucho tiempo que las personas más obesas son más propensas a desarrollar DM2, y la abrumadora evidencia científica ha demostrado esta impresión clínica²¹². La asociación de la obesidad con la DM2 se ha observado en las comparaciones de las diferentes poblaciones y dentro de poblaciones. Los estudios prospectivos de pacientes prediabéticos han demostrado de manera concluyente que la obesidad y su duración son los principales factores de riesgo para la DM2²¹³. Sin embargo, a pesar de la notable consistencia de la asociación entre las dos enfermedades, la obesidad no es suficiente ni necesaria para el desarrollo de la DM2⁶.

Así, las alteraciones cardiometabólicas más comunes son una mayor resistencia a la insulina y la dislipemia²¹⁴. Sin embargo, los pacientes NPME también poseen un nivel de TG y de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) aumentado, así como niveles de c-HDL reducidos, asemejándose al perfil de los obesos metabólicamente enfermos²¹⁵. Debido al uso del término sinónimo normopeso metabólicamente obeso acuñado por Ruderman²¹⁶, otros trabajos se guían por una excesiva cantidad de grasa de los individuos con normopeso. Sin embargo, el criterio más comúnmente utilizado es el de síndrome metabólico debido a su mayor estandarización¹⁰⁵ y a que, aunque son patologías muy relacionadas entre sí, cada vez hay más evidencia de que pueden llegar a ser independientes.

6.2. Prevalencia

La literatura científica ha estimado la prevalencia del fenotipo ObMS entre 10% y 34%, dependiendo de los criterios utilizados^{217,218,219}. El fenotipo ObMS parece ser más prevalente en mujeres que en varones y la prevalencia

disminuye con la edad en ambos sexos²²⁰. Mientras que con respecto al NPME se estima entre el 10 y el 37% de la población, dependiendo de la población estudiada^{221,222}.

En concreto en población andaluza disponemos del estudio de Gómez Huelgas *et al.* que realizaron un análisis transversal en una muestra aleatoria de 2.270 sujetos que clasificaron según criterios de IMC y de si presentaban alteraciones cardiovasculares o metabólicas según criterios ATP-III, incluyendo en el grupo de metabólicamente sanos la presencia de ≤ 1 criterio o en el grupo con anormalidad metabólica si reunían ≥ 2 criterios. De esta forma establecieron 6 grupos y observaron que la prevalencia de los fenotipos ObMS, sobrepeso metabólicamente sanos (SMS) y NPME de 2,2, 13,9 y 7,9% respectivamente. Mientras que el 9,6% de los obesos y el 32,6% de los individuos con sobrepeso eran metabólicamente sanos, el 21,3% de los sujetos de peso normal eran metabólicamente enfermos. Un modelo de regresión multivariante (ajustado por edad, sexo, y circunferencia de cintura) mostró que la edad superior a 40 años, sexo masculino, y una mayor circunferencia de cintura se asociaba de forma independiente con el fenotipo metabólico NPME, mientras que la edad más joven, el sexo femenino, y una menor circunferencia de la cintura se asociaba de manera independiente con los fenotipos metabólicamente sanos²²³.

En el estudio Pizarra, Soriguer *et al.*²²⁴ evaluaron a 1.051 individuos entre 1997-1998, que fueron reevaluados a los 6 y 11 años para estudiar la progresión del fenotipo ObMS al obeso metabólicamente enfermo (ObME). Se observó en la valoración basal una prevalencia del fenotipo ObMS entre el 3 y el 16.9% dependiendo del conjunto de criterios elegidos.

6.3. Criterios diagnósticos

Como ya se ha comentado anteriormente, no existe una definición estandarizada para los fenotipos discordantes. Se han utilizado múltiples enfoques. Tomando como ejemplo el del ObMS²⁰⁶, el fenotipo discordante más ampliamente estudiado, los enfoques más referenciados son los siguientes:

- Clamp hiperinsulinemia-euglucemia²²⁵.
- El cuartil superior de la tasa de eliminación de glucosa²²⁵.
- El cuartil superior de un índice de sensibilidad a la insulina tras una prueba de tolerancia oral a la glucosa²²⁶.
- Menos de dos de los siguientes trastornos cardiovasculares y metabólicos: (presión arterial sistólica ≥ 130 mmHg, presión arterial diastólica ≥ 85 mmHg, TG $\geq 1,7$ mmol/L o ≥ 150 mg/dl, glucosa en ayunas $\geq 5,6$ mmol/L, modelo de homeostasis de resistencia a la insulina (HOMA-IR) ≥ 5 , proteína C reactiva ultrasensible (PCR-US) $\geq 0,1$ mg/L, c-HDL $\leq 1,03$ mmol / L o 40 mg/dl en hombres y $\leq 1,3$ mmol/L o 50 mg/dl en las mujeres²¹⁷.
- Menos de tres criterios de síndrome metabólico²²⁷.
- Los sujetos con IMC superior a 30 kg/m² y los niveles de c- HDL de al menos 40 mg/dl en ausencia de DM2 y de hipertensión ²²⁸.

De cualquier forma, a pesar de esta disparidad de criterios, la mayoría de estudios definen el ObMS como el sujeto con IMC ≥ 30 kg/m² sin DM2, dislipemia o hipertensión²¹⁰. Hasta la fecha no hay unos criterios que identifiquen al ObMS²²⁹.

En cuanto al fenotipo menos estudiado, el NPME, tampoco hay un consenso acerca de la definición de estos individuos, ya que hasta la fecha, la mayor parte de la literatura científica se ha basado en estudiar la prevalencia de

dichos pacientes. La idea preponderante es que los pacientes NPME son aquellos individuos que, a pesar de tener un IMC equivalente a los individuos normopeso metabólicamente sanos (NPMS) (IMC 18,5-25 kg/m²), tienen un alto riesgo cardiometabólico²⁰⁹. En algunos estudios lo describen como obesidad con peso normal, el cual se define como un exceso de grasa corporal asociado con un IMC normal y se ha asociado con la inflamación temprana. En un grupo de mujeres suizas se vio que los pacientes con obesidad según criterio de porcentaje de masa grasa medida por impedanciometría, tenían mayor presión arterial, mayor prevalencia de dislipemia y mayor glucemia basal que los sujetos con normopeso mientras que esto no ocurría en las personas con sobrepeso²¹⁵.

Se han propuesto otros parámetros para la definición de síndrome metabólico en estos pacientes, como marcadores inflamatorios adicionales (PCR o el grado de leucocitosis)²³⁰ o la esteatosis hepática o hígado graso no alcohólico²²⁶. Así, la prevalencia del hígado graso no alcohólico parece ser significativamente mayor en los NPME que en los pacientes ObMS²²⁶ por lo que sería planteable la inclusión de este criterio emergente en el diagnóstico de enfermedad metabólica.

Sin embargo, de acuerdo con nuestro conocimiento actual, estas clasificaciones sólo se refieren a complicaciones metabólicas o cardiovasculares y no consideran que la obesidad pueda estar asociada con otras complicaciones no metabólicas tales como problemas ortopédicos, complicaciones pulmonares, u otras patologías²⁰⁶. Teniendo en cuenta que las descripciones del ObMS y del NPME son inconsistentes, falta mucho para terminar de aclarar los factores o mecanismos que subyacen a estos perfiles, y aunque algunos trabajos están tratando de estandarizar la definición del ObMS²³¹, el estudio del otro fenotipo es mucho más deficitario.

6.4. Fisiopatología

6.4.1. Inflamación subclínica

El tejido adiposo es un regulador clave de la inflamación, estando implicado en la aparición y desarrollo de aterosclerosis, síndrome metabólico, y DM2. La inflamación del tejido adiposo del NPME está estrechamente asociada con un mayor riesgo metabólico para DM2, enfermedades cardiovasculares y enfermedad de hígado graso, mientras que los adultos obesos sin inflamación de tejido adiposo presentan menor riesgo metabólico. Hay una evidencia creciente que permite explicar que la inflamación subclínica puede ser el mecanismo subyacente que determina si un individuo desarrollará enfermedad metabólica, independientemente de su masa grasa total²³².

Durante el desarrollo de la obesidad, casi la totalidad de las diferentes poblaciones inmunes se encuentran en el tejido adiposo²³³. La presencia de células inmunes en el tejido adiposo tiene un papel importante en la regulación de las funciones del tejido.

Actualmente se conoce que la población de las células inmunes cambia con la obesidad y la alteración metabólica²³⁴. Como se ha comentado previamente, los principales protagonistas de este fenómeno son los macrófagos. Los MTAs se originan a partir de monocitos derivados de la médula ósea, que se infiltran en el tejido desde el torrente circulatorio. Una fracción importante de los macrófagos se someten de forma inesperada a división celular a nivel local dentro del tejido adiposo, como se ha visto en estudios mediante la expresión del Ki67 y la incorporación de 5-etinil-20-desoxiuridina²³⁵. Los macrófagos dentro del TAV, muestran un aumento de la proliferación en la obesidad. El agotamiento de monocitos de sangre no tiene ningún impacto sobre el contenido de MTAs, mientras que su proliferación *in situ* continúa²¹⁶.

Los macrófagos residentes del tejido adiposo experimentan un cambio fenotípico de M2 a M1 a medida que la obesidad y la enfermedad metabólica se van desarrollando. La inflamación mediada por macrófagos es un componente clave de la resistencia a la insulina. Sin embargo, los acontecimientos iniciales de migración de monocitos para convertirse en macrófagos tisulares siguen siendo poco conocidos aunque se tienen algunos datos al respecto. En un estudio en el que se cuantificó el seguimiento *in vivo* de macrófagos de ratones donantes marcados con el tinte fluorescente pkh26 en ratones receptores, se observó que cuando los monocitos CCR2 *knockout* se inyectaban en los receptores tipo salvaje, o monocitos salvajes se donaban a receptores *knockout* de MCP-1, el acúmulo de MTAs se reducía un 40%, mientras que el contenido de macrófagos hepáticos se reducía en un 80%²³⁶. El uso de células donantes salvajes y el acúmulo de MTA es varias veces mayor en los ratones receptores obesos en comparación con los ratones con normopeso, independientemente de la fuente de monocitos de donantes. El sistema de CCR2 / MCP-1 es un factor que contribuye a la migración de los monocitos en el tejido adiposo y es la señal dominante que controla la aparición de macrófagos reclutados en el hígado²³⁵. El tratamiento con MCP-1 induce la división celular de macrófagos en explantes de tejido adiposo, mientras que el déficit de MCP-1 *in vivo* disminuye la proliferación de MTAs. Estos resultados revelan que, además del reclutamiento de monocitos sanguíneos, la proliferación *in situ* impulsada por MCP-1 es un proceso importante por la que los macrófagos se acumulan en el TAV en la obesidad²³⁵. Los monocitos de ratones obesos no están programados para convertirse en MTAs inflamatorios sino más bien el aumento del acúmulo de MTAs proinflamatorios en la obesidad es en respuesta a señales del tejido²³⁵.

En estudios realizados en tejido adiposo humano²³⁷, se demuestra que los MTAs de sujetos con sobrepeso se componen de distintos subconjuntos de macrófagos según la expresión de diversos marcadores de superficie

celular: CD45, CD14, CD31, CD44, HLA-DR, CD206 y CD16, evaluados mediante citometría de flujo. Los MTAs aislados por un protocolo de inmunoselección muestran una expresión mixta de factores proinflamatorios (TNF α , IL-6, IL-23, interleuquina 8 (IL-8), MCP-1, ciclooxigenasa-2 – COX-2 –) y antiinflamatorios (IL -10, TGF- β , quimioquina CC-1 asociada a la activación alternativa de macrófagos – AMA-CC1 – y ciclooxigenasa-1 – COX-1 –). El aumento de masa grasa se asocia con el acúmulo de macrófagos CD206 +/ CD16 –, que presentan un fenotipo de remodelación M2 caracterizado por una disminución de la expresión de IL-8 y de COX-2 y un aumento de la expresión del receptor-1 hialuronano del endotelio vascular linfático²³⁷. Los MTAs producen y liberan de forma específica metaloproteinasa-9 de la matriz que se ha relacionado *in vivo* con el IMC. Por último, los MTAs también ejercen un efecto proangiogénico marcado en las células endoteliales y progenitoras derivadas del tejido adiposo. Los MTAs pueden ser agentes activos en el proceso de desarrollo de tejido adiposo a través de la ampliación de la red capilar así como en la génesis de patologías cardiovasculares asociadas a la obesidad²³⁷.

Pero los macrófagos no son las únicas células inmunes residentes del tejido adiposo. La secreción de citoquinas por parte de los macrófagos, alienta la infiltración de otros tipos de células adicionales, como las células T y B²⁰⁹. Se ha visto que pacientes ObMS tienen un menor número de Th22 y Th17 en su TASC²³⁸, mientras que poseen un mayor número de células T reguladoras en sus tejidos viscerales²³⁹. Sin embargo, estas poblaciones aun no han sido testadas en sujetos NPME.

En la figura 12 se resume el proceso de infiltración de macrófagos en el tejido adiposo.

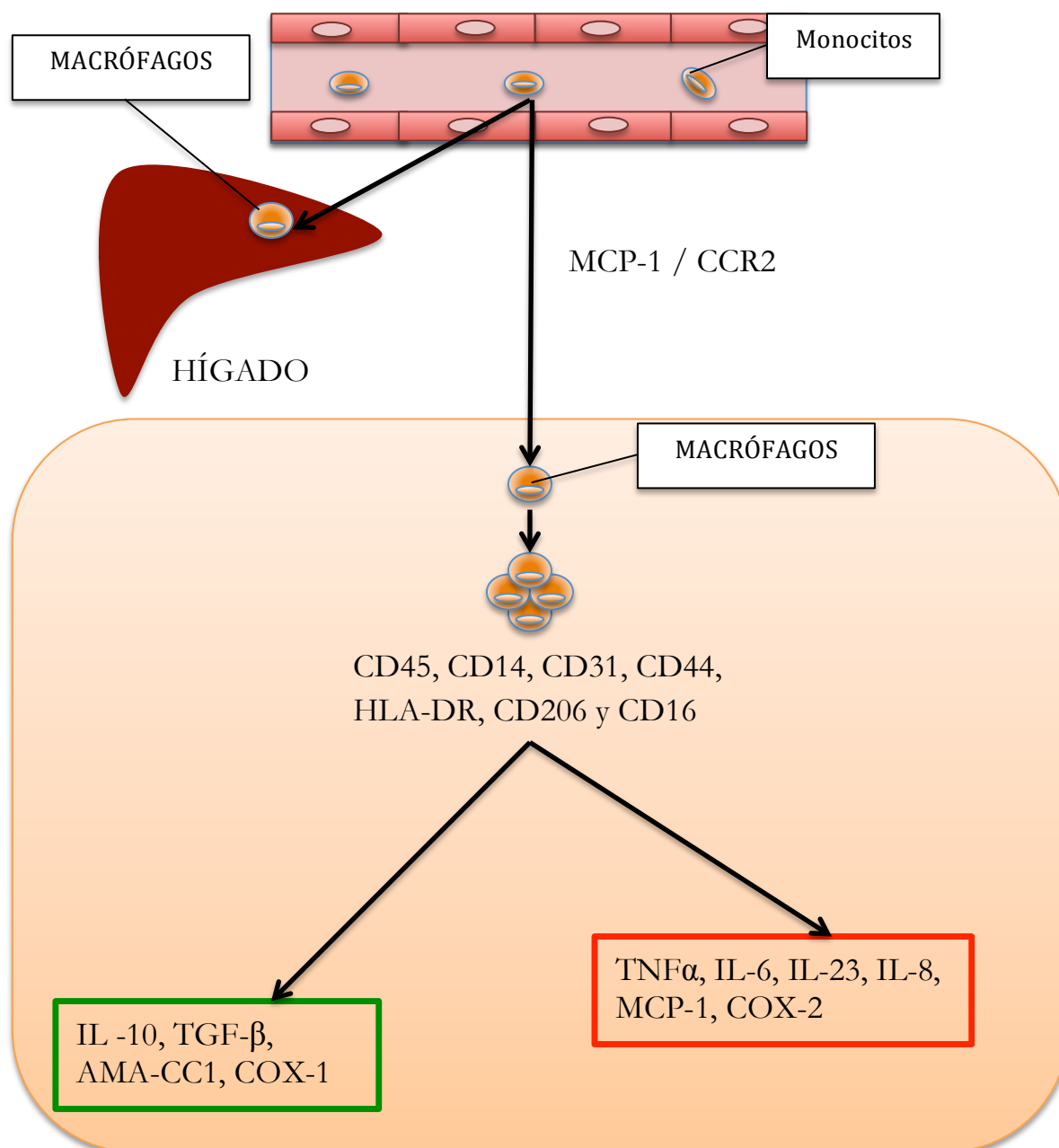


Figura 12.- Proceso de infiltración de macrófagos en el tejido adiposo. En rojo adipoquinas proinflamatorias. En verde antiinflamatorias.

En cuanto a los marcadores inflamatorios, actualmente la PCR se ha convertido en uno de los mejores predictores de la inflamación vascular, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares²⁴⁰. Existe una fuerte correlación entre los niveles circulantes de PCR y los marcadores antropométricos y de composición corporal, y ésta se ha propuesto como una

herramienta de detección para evaluar el riesgo de síndrome metabólico en sujetos jóvenes²⁴¹. En la edad adulta, el fenotipo ObMS se asocia con niveles bajos de complemento C3, PCR, TNF α , IL-6, y con un número bajo de leucocitos en sangre, apoyando el concepto de un estado inflamatorio más favorable en comparación con sujetos obesos metabólicamente enfermos (ObME)²⁴².

La exploración de la función y la morfología del tejido adiposo en los individuos NPME tiene el potencial de ayudar a mejorar nuestra comprensión de este fenotipo, así como para entender la relación entre el tejido adiposo y el riesgo cardiometabólico de manera independiente al IMC. Se han encontrado niveles de citoquinas inflamatorias (IL-6, TNF α y leptina) elevados en sangre circulante en el NPME²⁴³. Di Renzo *et al.* encontraron que los niveles circulantes de citoquinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF α) en los individuos NPME eran comparables a los de los individuos ObME²⁴⁴, mientras que De Lorenzo *et al.* encontraron que estos niveles estaban elevados con respecto a aquellos con NPMS²⁴⁵. Por otro lado, se ha sugerido que el polimorfismo TNF α contribuye a una mayor susceptibilidad a presentar sarcopenia en sujetos con normopeso y proporción elevada de masa grasa con respecto a la muscular²⁴⁶.

Las adipoquinas anti-inflamatorias tales como la adiponectina, IL-4, IL-10, IL-13, el antagonista del receptor de IL-1 y el TGF- β son abundantes en el tejido adiposo de individuos con normopeso, mientras que en el tejido adiposo del obeso predomina la liberación de adipoquinas pro-inflamatorias incluyendo leptina, resistina, TNF α , IL-6, IL-18, proteína 4 de unión a retinol, lipocalina 2, proteína de tipo angiopoyetina 2, ligando de quimioquinas CC-2, ligando 5 de quimioquina-CXC y fosforribosil transferasa nicotinamida¹³². Un estudio demostró que el 20% de los pacientes con un IMC superior a 40 kg/m² tenían niveles de adiponectina por encima de la media de los sujetos con un IMC normal, y estos niveles de adiponectina por encima de cierto umbral incrementaban la probabilidad de ser metabólicamente saludable,

incluso después de corregir por factores de confusión como edad, insulinemia y perímetro de cintura²²⁸. Esto sugiere que la adiponectina juega un papel crucial en la patogénesis de complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad ya que los pacientes con el fenotipo ObMS tienen niveles similares de adiponectina a las encontradas en los sujetos de peso normal²²⁸.

Otros marcadores de inflamación sistémica o marcadores de inflamación del tejido adiposo son los AGL y el número y el estado de activación de los leucocitos periféricos. Así, los pacientes obesos con DM2 tienen mayores niveles circulantes de IL-6, AGL y glicerol y un mayor número absoluto de leucocitos periféricos en comparación con los sujetos obesos no diabéticos^{247,208}. Del mismo modo los sujetos con obesidad mórbida sin enfermedad metabólica tienen un bajo grado de resistencia a la insulina y los marcadores de inflamación del tejido adiposo son similares a los de los sujetos no obesos: sin infiltración de macrófagos y valores elevados en la expresión de TNF α e IL-6 en el TAV²⁴⁸.

Todos estos resultados sugieren que los pacientes ObME presentan mayor grado de inflamación sistémica y local de la grasa en comparación con los individuos ObMS²⁴⁷.

Estas poblaciones y los factores que segregan, como las citoquinas, van a desencadenar una serie de procesos con los que la alteración del tejido adiposo se va a hacer más patente y que desembocarán en IR y otras alteraciones del metabolismo sistémico. De hecho, PPAR γ , la molécula central en adipogénesis, además conduce a la acumulación de células inmunes en el tejido adiposo²⁴⁹.

En la figura 13 se resumen las diferencias bioquímicas descritas en los distintos fenotipos.

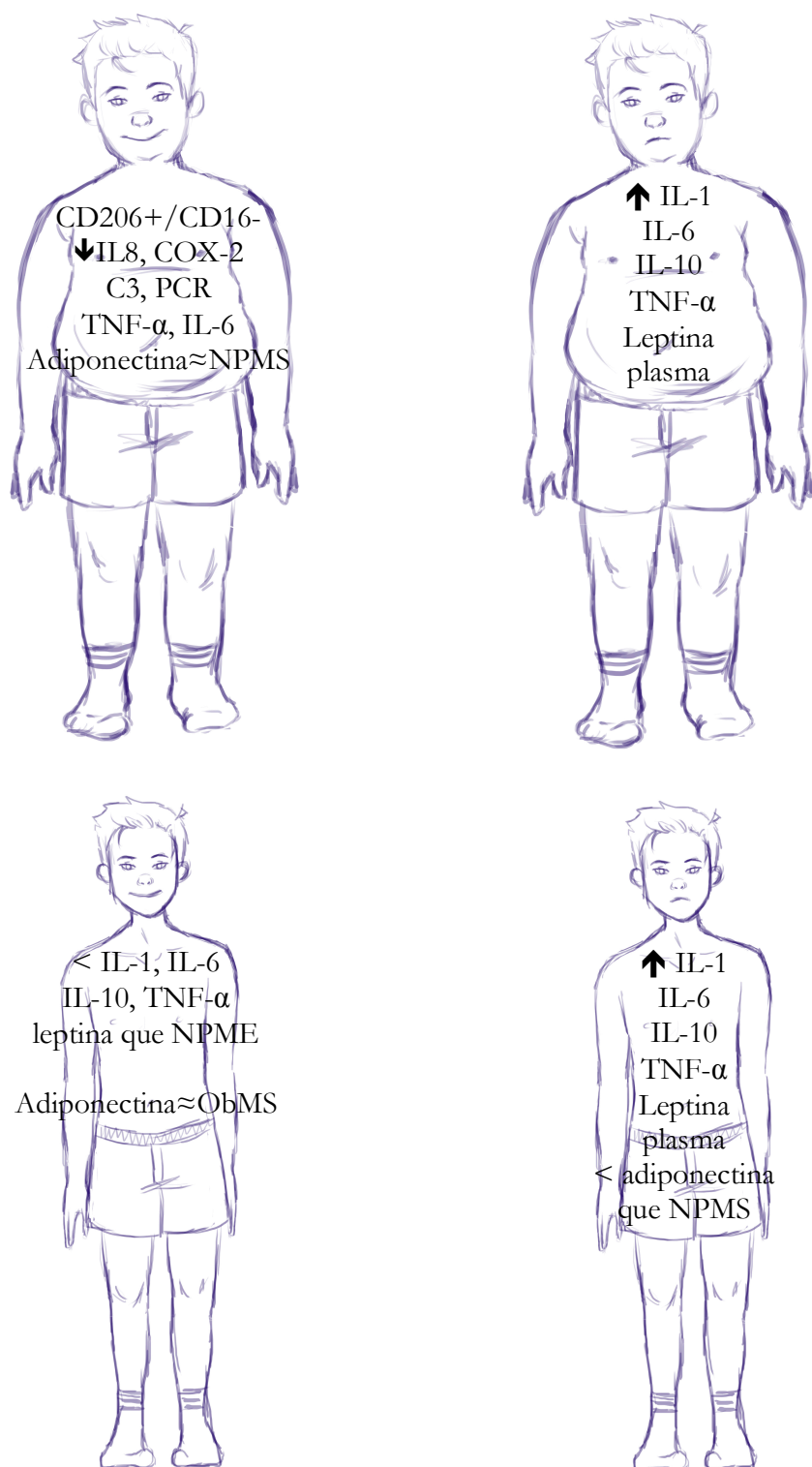


Figura 13.- Diferencias bioquímicas entre los distintos fenotipos.

6.4.2. Expansibilidad e insuficiencia del tejido adiposo

Anteriormente, para explicar la transición del estado normal del tejido adiposo al estado que produce anomalías metabólicas, los estudios propusieron la "hipótesis en la capacidad de expansión del tejido adiposo". Ésta postula que, una vez que los adipocitos alcanzan el umbral de capacidad para el almacenamiento, comienzan a promover la resistencia a la insulina con lipotoxicidad y liberación de adipocinas. Esto fue apoyado por estudios *knockout* con modelos de PPAR γ , lipodistrofia y alteraciones en la secreción de adipocinas tras la saturación del tejido adiposo. La investigación de este hecho condujo a la caracterización adicional de los contribuyentes genéticos de las vías de la adipogénesis (SFRP1, Wnt, S14), la apoptosis (TRAIL, TWEAK, BCL2, CASP3 / 7), y la angiogénesis (VEGF-A, -B, -C, -RE). Para mejorar la comprensión del tejido adiposo en el contexto de los pacientes ObMS, Tinahones *et al.* buscaron genes que asociaran la lipólisis y la lipogénesis con el IMC, la insulina y el HOMA-IR. Encontraron una correlación positiva en PPAR γ , DGAT1, AQP7, GK, ATGL, HSL, y perilipina y el IMC, insulina y HOMA-IR en ambos tejidos de grasa subcutánea y visceral. Además, demostraron una correlación negativa entre genes - ACC1, PEPCK, ACSS2, FABP4 - y las medidas antes mencionadas de riesgo metabólico²⁰⁶.

Una teoría bastante sólida atribuye las diferencias entre los sujetos ObMS y los ObME a la distinta capacidad de adaptación al exceso de energía en el tejido adiposo²⁵⁰. Cuando se requiere un mayor almacenamiento de grasa, el tejido adiposo necesita aumentar su capacidad de almacenamiento y puede aumentar el tamaño de los adipocitos o aumentar su número¹⁴¹. Además, este aumento de la cantidad total de grasa deberá ir acompañada de un aumento de la vascularización¹⁷⁶. En aquellos sujetos en los que el tejido adiposo tiene dificultades para expandirse de forma saludable, que es

aumentando la celularidad, aparece la enfermedad metabólica²⁵¹. Eso es lo que vemos en los ObMS que mantienen la capacidad de almacenamiento adecuada. Pero la pérdida de la capacidad de expansión también puede ocurrir en pacientes con peso normal, por lo que esta teoría podría explicar la existencia de sujetos NPME, cuando aparece la insuficiencia del tejido adiposo²⁰³. Además, la falta de capacidad de expansión del tejido adiposo se ha relacionado con la pérdida de su función principal lipogénica, y la aparición de productos lipotóxicos en el tejido adiposo²⁵².

Por otra parte, los individuos con el fenotipo ObMS tienen un menor contenido de grasa visceral, hepática y muscular que los sujetos ObME, lo que sugiere que el fenotipo ObMS se asocia con una mejor capacidad de captar AGL en el tejido adiposo²²⁶. Estas diferencias en la composición corporal entre ObMS y ObME son consistentes entre géneros²¹⁷.

Tradicionalmente se pensaba que había poca renovación de las células en el tejido adiposo en la edad adulta. Hoy en día se sabe que el tejido adiposo es capaz de hiperplasiarse durante toda la vida: las células madre progenitoras son las responsables de esta hiperplasia del tejido adiposo^{141,140,159}. Los preadipocitos que se encuentran en el estroma vascular, son células progenitoras que se diferencian en adipocitos maduros a través de un programa complejo de expresión génica^{159,161,162,163}. Otra variable que se relaciona directamente con el número total de células grasas es la muerte celular, que puede ocurrir por necrosis, apoptosis o autofagia^{164,167}. Estos estudios también han aludido a la reducción de la hipertrofia de los adipocitos, la fibrosis y el estrés como posibles contribuyentes a esta presentación.

Se ha demostrado que los sujetos metabólicamente sanos tienen una mayor capacidad lipogénica^{191,253} y angiogénica^{254,255} que los pacientes metabólicamente poco saludables. Además, también hay evidencia considerable de que la adipogénesis y la funcionalidad de las células

mesenquimales para convertirse en nuevos adipocitos es mayor en los sujetos metabólicamente sanos ya que presentan células mesenquimales en el estroma del tejido adiposo, con una mayor capacidad de diferenciarse tanto a hueso como a tejido adiposo, presentando una menor senescencia¹⁶³. Este aumento de la capacidad de formar nuevos adipocitos en los individuos ObMS muestra claramente que la apoptosis de los adipocitos aumenta con la obesidad, y esto tiene una relación directa con el grado de inflamación del tejido adiposo¹⁶⁸.

Hace más de 30 años Ruderman *et al.* describieron, partiendo de la premisa de que la DM2, HTA e hipertrigliceridemia se asociaban con frecuencia en la obesidad y que mejoraba con la restricción calórica, que había pacientes con estas patologías que no eran obesos de acuerdo con los estándares de peso o con otros criterios disponibles en el momento, pero que de la misma manera respondían de forma favorable a la restricción calórica. Estos sujetos presentaban hiperinsulinismo y probablemente un incremento en el tamaño de sus células adiposas en comparación con pacientes de edad peso y talla similar o con ellos mismos en periodos más precoces²⁵⁶.

Una de las teorías que sostienen el hecho de la existencia de NPME se centra en la limitación de la capacidad funcional del tejido adiposo. Cuando se supera esta capacidad, se producen trastornos metabólicos²⁵⁷. Esto sugiere que el factor que une la obesidad, la DM2 y las comorbilidades asociadas puede no ser la cantidad absoluta de grasa acumulada, sino el desajuste entre el exceso de energía y la capacidad de almacenamiento²⁵⁰. Este nuevo enfoque sitúa al tejido adiposo en el mismo nivel que otros órganos vitales: del mismo modo que se puede hablar de insuficiencia cardíaca, hepática o renal, también podríamos hablar de insuficiencia del tejido adiposo.

Con todo lo anterior, parece indudable que la homeostasis de los individuos NPME se ha perdido, y que esta pérdida podría provenir de la pérdida de “diálogo” entre los diferentes órganos.

6.4.3. Otros posibles mecanismos

Los factores de estilo de vida tales como el nivel de actividad física o la condición cardiorrespiratoria también parecen jugar un papel clave en la distinción de si un individuo es un fenotipo discordante o no. Así, los sujetos ObMS presentan mayores niveles de actividad física en comparación los individuos ObME y tienen un estilo de vida más saludable^{227,258,259}. Del mismo modo, la actividad física ocupacional o en tiempo de ocio también parece ser importante, ya que los dos regímenes de ejercicio se asocian de forma diferente con la obesidad y la resistencia a la insulina²⁶⁰.

Un factor potencial nuevo para explicar las diferencias entre ObMS y ObME podría estar relacionado con el microRNA²⁶¹. La resistencia a la insulina en los órganos periféricos, tales como el hígado, puede desarrollarse por un estímulo tóxico, iniciando la secreción de microRNAs asociados con la IR, que se incorporan en las células musculares y adiposas, induciendo así la IR²⁶² en estos tejidos.

Está cobrando también interés el estudio de la longitud de los telómeros, la cual es distinta en función del tejido donde se mida. Así, Lakowa *et al.* encontraron que los telómeros en TASC eran más cortos que en TAV en pacientes obesos²⁶³. De esta manera, el acortamiento de los telómeros en tejido subcutáneo podría contribuir a las alteraciones metabólicas. Pero no solo las poblaciones residentes son las culpables de esta disfunción del tejido adiposo, si no que hay muchos otros factores que influyen en el desarrollo de este ambiente hostil, y que no han sido aun tratados en pacientes NPME. La obesidad está asociada con el acortamiento en la longitud de los telómeros²⁶⁴. La longitud de los telómeros puede servir como un biomarcador de la edad biológica (*vs.* cronológica) de una célula. Es otro punto importante en la investigación actual sobre la fisiología del tejido adiposo. Se ha visto que la

longitud de los telómeros de las células del TASC se asocia negativamente con el IMC, la presión arterial sistólica y los TG basales. Curiosamente, los pacientes que anteriormente fueron obesos tienen menor longitud en sus telómeros que los que nunca han sido obesos de la misma edad, sexo e IMC, lo que sugiere que esta es una característica establecida, irreversible de la obesidad que podrían contribuir a sus comorbilidades²⁶⁵. Aunque aun no se ha llegado a comprender completamente el proceso, una posible explicación es la elevada inflamación, ya que se ha asociado con niveles elevados de PCR²⁶⁶. Sin embargo, son estructuras activas que reaccionan a intervenciones tales como una intervención dietética, aumentando su longitud²⁶⁷.

Otro factor emergente a añadir a la ecuación es la microbiota intestinal, la cual se ha posicionado como factor clave en las enfermedades metabólicas, ya que ejerce su función sobre numerosos órganos, tales como el tejido adiposo, intestino, músculo, hígado o cerebro²⁶⁸. Uno de los múltiples mecanismos descritos por los que la microbiota interviene sistémicamente es la endotoxemia, un incremento del nivel plasmático de LPS, algo que sucede debido a alteraciones en la permeabilidad de la barrera intestinal²⁶⁹. Si bien el hecho de que la microbiota intestinal interviene en el desarrollo de la obesidad y otras enfermedades metabólicas está demostrado²⁷⁰, hasta el momento la literatura científica no se ha centrado en estudiar los diferentes perfiles de la microbiota de los fenotipos discordantes como los NPME. Sin embargo, en un estudio acerca de los cambios metabólicos en osos hibernantes, Sommer *et al.* encontraron que el paso de estos animales a obesos metabólicamente sanos durante el verano se produce gracias a la microbiota intestinal²⁷¹. De esta manera, se sugiere que la microbiota intestinal podría ser un factor clave en el estudio de los fenotipos discordantes y su comprensión.

6.5. Resultado de la intervención en los fenotipos discordantes

La característica decisiva del ObMS es la ausencia de acumulación de grasa visceral. Aunque no haya una predisposición genética al estado de ObMS descrita, actualmente se recomiendan modificaciones en el estilo de vida dirigidas a reducir al mínimo la acumulación de grasa visceral. Sin embargo, no está del todo claro si los sujetos obesos con un fenotipo ObMS se beneficiarían de las intervenciones de estilo de vida tradicionales, que se centran en la terapia de la dieta y / o el aumento de ejercicio físico²⁰⁶.

Pocos estudios han analizado los efectos metabólicos de las modificaciones de estilo de vida con una dieta y / o ejercicio restrictivo en sujetos ObMS, y sus resultados han sido contradictorios^{272,273}. Basándonos en la teoría que apoya que los ObMS y los ObME requieren un enfoque terapéutico distinto, Karelisy *et al.* demostraron que los individuos ObMS reaccionaron de manera diferente, desde un punto de vista metabólico, a una dieta hipocalórica durante seis meses en comparación con personas obesas "en riesgo" a pesar de lograr una pérdida de peso similar²⁷⁴. Hay algunos estudios que mostraron que la combinación de una dieta mediterránea asociada a intensidad de entrenamiento aeróbico moderada-alta es más eficaz en la mejora de la composición corporal^{275,276}. Aunque el mensaje de salud pública para todos los pacientes obesos debe seguir promoviendo hábitos de vida saludables, los resultados controvertidos de las intervenciones de estilo de vida en individuos ObMS justificarían priorizar, por razones de costo-eficacia, las intervenciones intensivas en individuos ObME y la monitorización de sujetos a ObMS para la detección del desarrollo de patología metabólica²⁷⁷.

Actualmente, la cirugía bariátrica sigue siendo una de las mejores opciones para los pacientes que sufren de obesidad severa, con excelentes resultados en cuanto a la pérdida de peso a largo plazo y reducción del tamaño

de depósito de grasa periférica y visceral²⁷⁸. Se necesita más investigación para estudiar los efectos de los diferentes enfoques terapéuticos sobre el perfil metabólico de los individuos sanos pero obesos. Los resultados en este área son esenciales para la comprensión de la fisiopatología y para la puesta en práctica de estrategias de intervención en ObMS.

En este sentido no se disponen de datos respecto a la intervención en hábitos de vida del NPME y de si estos pueden conferir beneficios en la resolución del engranaje inflamatorio y metabólico que es la base de la insuficiencia de su tejido adiposo.

6.6. Persistencia del fenotipo obeso metabólicamente sano en el tiempo

Continúa el debate respecto a si los individuos ObMS son verdaderamente saludables. La literatura difiere con respecto al riesgo relativo de enfermedad en esta población. Los ObMS tienen un riesgo disminuido de desarrollar enfermedad cardiovascular en comparación con individuos ObME²⁷⁹. Los estudios a largo plazo han propuesto que el ObMS es un estado transitorio. Por ejemplo, entre un grupo de estadounidenses de origen japonés ObMS, dos tercios desarrollaron síndrome metabólico durante los 10 años de observación, y la anormalidad metabólica se asoció de forma independiente con el acúmulo de grasa visceral, el sexo femenino, una mayor insulina plasmática en ayunas y una menor concentración de c-HDL en suero²⁸⁰.

En consonancia con este informe, de entre los 1.051 participantes del estudio Pizarra, la prevalencia ObMS disminuyó durante 11 años de observación a expensas del aumento del fenotipo ObME²²⁴.

Los individuos ObMS no están en mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares en comparación con los sujetos NPMS^{281,282,283,284}. Los estudios con períodos de seguimiento más largos (mayores de 15 años) han demostrado que los ObMS presentan mayor riesgo de eventos cardiovasculares mayores en comparación con los individuos NPMS^{285,286}.

Recientemente, en un estudio sistemático donde se evaluó la asociación entre IMC y el estado metabólico con la mortalidad total y eventos cardiovasculares, se observó que los individuos ObMS parecían presentar mayor riesgo de eventos cardiovasculares en comparación con individuos NPMS²⁸⁷. Estos investigadores concluyeron que los individuos obesos tienen un mayor riesgo de resultados adversos a largo plazo, incluso en ausencia de anormalidades metabólicas, en comparación con los individuos NPMS.

Un estudio reciente evaluó la prevalencia de PCR-US en plasma elevada y la esteatosis hepática en ObMS y NPMS y en NPME²⁸⁸. Observaron que el aumento en la concentración de PCR-US plasmática y la esteatosis hepática eran más frecuentes entre los individuos ObMS y NPME. Sin embargo, son más prevalentes entre los individuos ObMS, lo que sugiere que la obesidad en ausencia de factores de riesgo metabólicos no es completamente benigna y se asocia con inflamación vascular subclínica.

Otro estudio reciente observó que el 42% de sus sujetos ObMS desarrollaban síndrome metabólico tras 10 años de seguimiento²⁸⁹, lo que sugiere de nuevo que los ObMS no dejan de tener mayores riesgos de salud. Sin embargo, la identificación de predictores, los determinantes biológicos, los mecanismos subyacentes del ObMS, la determinación de si el ObMS representa un fenotipo transitorio que se ve afectado por el envejecimiento, comportamiento y factores ambientales, y calcular con exactitud los

verdaderos riesgos para la salud asociados con el fenotipo ObMS siguen siendo temas viables para el estudio mediante estudios longitudinales adecuadamente diseñados y realizados. Esto se hace extensible al fenotipo NPME, del que se ha detectado una completa falta de información, y muy especialmente de la fisiopatología de su tejido adiposo.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha cobrado gran importancia el estudio de la fisiopatología de la obesidad y la enfermedad metabólica asociada, dado el gran incremento de la prevalencia de ambas.

Tradicionalmente se ha utilizado el IMC como medida para definir al paciente obeso, considerándolo con mayor riesgo cardiovascular. Sin embargo, en los últimos años se han buscado otros métodos de valoración para el enfoque de estos pacientes. Y es que se ha observado que existen grupos de sujetos conocidos como fenotipos discordantes, que no se encuadran dentro del esquema clásico de obesidad-enfermedad metabólica. Estos pacientes están generando gran polémica acerca de su clasificación.

Dentro de ellos, el más estudiado es el fenotipo ObMS el cual, a pesar de presentar un IMC patológico, no padece enfermedad metabólica. Se conoce mucho acerca de su prevalencia, fisiopatología y su perfil clínico aunque no se disponen de criterios claros para su diagnóstico. Sin embargo, la literatura disponible sobre el fenotipo NPME es más escasa, y se basa fundamentalmente en el estudio de su prevalencia en distintas poblaciones, siendo su fisiopatología, riesgo cardiovascular y opciones terapéuticas menos conocidos. No hay tampoco consenso acerca de la definición de estos individuos.

Las guías clínicas actuales fallan en la individualización del manejo de estos pacientes, y especialmente en el manejo de los pacientes NPME, los cuales presentan un riesgo metabólico elevado.

Sería necesario por tanto consolidar el conocimiento sobre la fisiopatología del tejido adiposo en individuos con normopeso, con el fin de poder comprender el proceso de alteración del tejido adiposo que conlleva a enfermedades metabólicas tales como la obesidad, la hipertensión arterial, la dislipemia o la DM2, entre otras. De esta manera, se conseguiría un arma terapéutica efectiva y precoz para prevenir su aparición o asegurar su curación.

HIPÓTESIS

- Incluso antes del desarrollo de la propia obesidad, la función endocrina del tejido adiposo tiene un papel importante en la aparición de las complicaciones asociadas clásicamente a la misma, interviniendo en la sensibilidad a la insulina, la inflamación y el metabolismo lipídico.
- La exploración de la función y la morfología del tejido adiposo en los individuos NPME tiene el potencial de ayudar a mejorar nuestra comprensión sobre el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones, así como para entender la relación entre el tejido adiposo y el riesgo cardiometabólico de manera independiente al IMC.
- El tejido adiposo visceral y subcutáneo presentan una asociación diferente con el riesgo de enfermedad metabólica y vascular. Clásicamente el TAV se ha relacionado con una mayor infiltración de macrófagos que el TASC, si bien esta relación no ha sido estudiada en sujetos NPME.

OBJETIVOS

GENERAL:

Estudiar la implicación del tejido adiposo en el desarrollo de la enfermedad metabólica en sujetos con normopeso con síndrome metabólico, en comparación con los sujetos con normopeso metabólicamente sanos.

ESPECÍFICOS

- Conocer los marcadores metabólicos más relevantes en el sujeto con normopeso con enfermedad metabólica.
- Conocer la implicación de la infiltración de las células inmunes en el tejido adiposo en el desarrollo de la enfermedad metabólica en sujetos con normopeso.
- Estudiar la funcionalidad del tejido adiposo subcutáneo y visceral en los sujetos con normopeso con enfermedad metabólica.
- Describir la relación entre los marcadores inflamatorios y adipogénicos y los parámetros del síndrome metabólico en sujetos con normopeso.
- Describir nuevos marcadores plasmáticos de enfermedad metabólica en sujetos con peso normal.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal. Los pacientes se reclutaron durante la práctica clínica habitual de la Unidad de Cirugía General y Digestiva del Hospital Universitario Virgen de la Victoria.

El estudio se realizó de acuerdo con las directrices establecidas en la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito (Anexo 1) y el estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica Málaga Noroeste (Anexo 2).

2. Población de estudio

Se incluyó de forma secuencial a todos los pacientes sometidos a colecistectomía o cirugía de hernia de hiato mediante laparoscopia desde 2012 hasta 2013. Todas las cirugías fueron programadas, no urgentes. En el momento de la cirugía todos los pacientes estaban asintomáticos.

Dada la complejidad para el reclutamiento de sujetos de estas características y la ausencia de estudios en base a los mismos, se estableció un periodo de inclusión secuencial durante el tiempo establecido para el análisis de la muestra incorporada en tal fecha.

2.1. Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión para participar en el estudio fueron:

- Sujetos con IMC 18,5-24,9kg/m².
- Edad mayor de 18 años.
- Entender el objetivo del estudio y firmar el consentimiento informado.

2.2. Criterios de exclusión

- Presentar patología infecciosa en los tres meses previos a la inclusión en el estudio.
- Padecer enfermedad cardiovascular, artritis, enfermedad inflamatoria aguda, enfermedad infecciosa o enfermedad renal.
- Estar en tratamiento con fármacos que pudieran alterar el perfil lipídico o los parámetros metabólicos en la fase de inclusión del estudio.
- No firmar el consentimiento informado.

2.3. Clasificación de los sujetos

Estos sujetos fueron clasificados de acuerdo al grado de síndrome metabólico, definido según los criterios del ATP-III:

- Perímetro de cintura ≥ 102 cm en varones o ≥ 88 cm en mujeres.
- TG plasmáticos ≥ 150 mg/dl.
- c-HDL < 40 mg/dl en varones o < 50 mg/dl en mujeres.
- Tensión arterial sistólica ≥ 130 mmHg o tensión arterial diastólica ≥ 85 mmHg.
- Glucemia plasmática en ayunas ≥ 110 mg/dl.

Según estos criterios se dividieron en dos grupos: sujetos con NPMS con dos criterios o menos de síndrome metabólico y sujetos con NPME que reúnan tres o más criterios de síndrome metabólico.

3. Variables de estudio y procedimientos

3.1. Medidas antropométricas y parámetros analíticos

La altura se midió con una precisión de 0,5 cm y el peso corporal de 0,1 kg. El IMC se calculó como el peso (kilogramos) dividido entre la talla (metros) al cuadrado. El perímetro de cintura se midió en la zona media entre el borde inferior de la última costilla y la cresta ilíaca.

Antes de la cirugía, se extrajeron muestras de sangre basales de la vena antecubital en tubos vacutainer (BD vacutainer, London, UK). Se separó el suero mediante centrifugación durante 15 minutos a 4000rpm, congelándose inmediatamente a -80°C , donde permaneció, almacenándose hasta su posterior análisis. Mediante métodos enzimáticos (Randox Laboratories Ltd., UK), en un autoanalizador Dimension (Dade Behring Inc., Deerfield, Ill) se midieron los siguientes parámetros: glucosa, colesterol, TG, c-HDL, péptido C, urea, creatinina, ácido úrico, GOT, GPT, GGT, ferritina, transferrina, hierro, HbA1c, ApoA1, ApoB, calcio, fósforo, PCR, leptina, adiponectina, osteocalcina, PTH y 25OH Vitamina D3. El c-LDL se calculó mediante la ecuación de Friedewald. La insulina se cuantificó mediante radioinmunoensayo suministrado por BioSource International, (Camarillo, Calif).

El modelo de homeostasis de resistencia a la insulina (HOMA-IR) se calculó a partir de insulina y glucosa en ayunas con la ecuación:

$$HOMA - IR = \frac{\text{insulina en ayunas (mUI / mL)} \times \text{glucosa en ayunas (mmol / L)}}{22.5}$$

3.2. Muestras de tejido adiposo para expresión de mRNA

Se obtuvieron muestras mediante biopsia de TASC y TAV de todos los sujetos. Las muestras se obtuvieron durante la reparación de hernia de hiato o la colescistectomía. Las muestras se lavaron en suero salino e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras biopsiadas se mantuvieron a -80°C hasta su posterior el análisis.

3.3. Aislamiento de RNA y expresión génica

Se aisló el RNA total del tejido adiposo usando RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, GmbH, Germany), tratándose con DNasa (RNase-free DNase Set; Qiagen). La concentración y la pureza de RNA se determinaron mediante la absorbancia a 260nm (A260) y el ratio A260/A280 con un espectrómetro Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, Del) respectivamente. Para la síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó la transcripción inversa de una cantidad constante de 1mg de RNA usando hexámeros aleatorios como cebadores y la transcriptasa inversa.

La expresión génica se evaluó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real usando un sistema de reacción en cadena de la polimerasa Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). La reacción se realizó siguiendo el protocolo del fabricante. El programa consistió en una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, a continuación 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización de fase a 95°C, y luego una fase de hibridación y extensión de 1 minuto a 60°C. Se utilizaron los conjuntos prevalidados de sondas Taqman disponibles

comercialmente para muestras humanas. Los que se usaron en el estudio fueron los siguientes:

- Cyclophilin A: 4326316E, RefSeq. NM_021130.3. Usado como control endógeno en cada reacción.
- TNF α : Hs 01113624_g1, RefSeq NM_000594.3.
- IL-6: Hs 00985639_m1, RefSeq NM_000600.3.
- PPAR γ : Hs 01115513-m1, RefSeq NM_015869.4.
- ITGAM (CD11b): Hs 00355885_m1, RefSeq NM_000632.3.
- CD33: Hs 01076281_m1, RefSeq NM_001082618.1.
- EMR1: Hs 00892591_m1, RefSeq NM_001256252.1.
- CD68: Hs 02836816_g1, RefSeq NM_001040059.1.
- CD163: Hs 00174705_m1, refSeq NM_004244.5.
- FABP4: Hs 01086177_m1, RefSeq NM_001442.2.
- CD206: Hs00267207_m1, RefSeq NM_002438.3.
- ITGAX (CD11c): Hs00174217_m1, RefSeq NM_000887.3.
- MerTK: Hs01031973_m1, RefSeq NM_006343.2.
- CD64: Hs00417598_m1, RefSeq NM_001017986.3, NM_001244910.1, NM_000566.3.
- IL-10: Hs00961622_m1, RefSeq NM_000572.2.
- IL-1b: Hs00174097_m1, RefSeq NM_000576.2.
- CCL2: Hs00234140_m1, RefSeq NM_002982.3.
- CCL3 (MIP1 α): Hs00234142_m1, RefSeq NM_002983.2.

Se obtuvo un ciclo umbral (valor Ct) para cada curva de amplificación y se calculó un valor ΔC_t restando primero el valor de Ct para el correspondiente cDNA control endógeno a partir del valor Ct para cada gen nativo y transcripción. Los cambios comparados con el control endógeno se determinaron calculando el índice $2^{-\Delta C_t}$.

3.4. Aislamiento y expansión de la fracción de las células derivadas del estroma vascular del tejido adiposo subcutáneo y visceral

Debido a la baja disponibilidad de tejido, para este propósito se usaron muestras de TASC y TAV procedentes de sujetos diferentes a los descritos anteriormente. Estas muestras se obtuvieron de cinco pacientes con un IMC inferior a 30kg/m² dada la cantidad de tejido necesaria, denominados como SMS y de cuatro con sobrepeso metabólicamente enfermos (SME), para cultivar la fracción de células derivadas del estroma vascular y para la diferenciación adipogénica posterior.

Las biopsias de tejido adiposo se lavaron con PBS para eliminar los desechos celulares y se diseccionaron en trozos pequeños mediante digestión enzimática en una solución de 0,150% de colagenasa tipo I y 1,0% de suero de albúmina bovina durante 70 minutos a 37°C en un baño de agua con agitación.

La suspensión tisular obtenida a partir de la digestión enzimática se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos y los adipocitos flotantes se separaron de la fracción vascular del estroma precipitado por decantación, que se filtró a través de una malla de 100 µm y se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió en tampón de lisis de eritrocitos durante 10 min a temperatura ambiente y después se centrifugó de forma adicional durante 5 min. El sedimento de nuevo se resuspendió en DMEM / F12 suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 mg / ml de estreptomicina, 100 U / ml de penicilina, y 2 mM de L-glutamina. Las células se sembraron en matraces de cultivo para tejidos y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante aproximadamente 8 días hasta que se alcanzó el 90% de confluencia.

3.5. Diferenciación adipogénica

Continuando con las 9 fracciones del estroma vascular de TASC y TAV (5 de SMS y 4 de SME), en el 90% de confluencia, el tampón de expansión se reemplazó por un tampón adipogénico (tampón de expansión más 10 μ M de insulina, 0,5 μ M de isobutylmetilxantina, 1,0 μ M de dexametasona, 10 μ M de pioglitazona, 0,5 μ M de rosiglitazona, 33 μ M de biotina y 17 μ M pantenoato). Después de 72 horas, este tampón se reemplazó por un tampón similar sin isobutylmetilxantina, biotina o pentanoato hasta el día 14, renovando cada 2-3 días. El estado adipogénico fue confirmado por la fijación con formalina, seguido de la tinción de vesículas lipídicas durante 1 hora con Oil Red O al 30%.

Además, se obtuvo el RNA total de las células mesenquimales diferenciadas mediante el kit comercial STAT-60™ kit (Ambio, Abingdon, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA y su pureza se determinaron con un espectrómetro Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, Del). El paso a cDNA y el análisis de expresión génica de marcadores adipogénicos se realizó tal y como se ha detallado previamente con los siguientes cebadores:

- LPL (Hs 00173425_m1, RefSeq NM_000237.2)
- FABP4 (Hs 01086177_m1, RefSeq NM_001442.2)
- CEBP α (Hs 00269972-s1, RefSeq NM_004364.3)
- LEP (Hs 00174877-m1, RefSeq NM_000230.2)
- ADRP (Hs 00765634-m1, RefSeq NM_001122.3)
- PPAR γ (Hs 01115513-m1, RefSeq NM_015869.4)

4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con SPSS (versión 15 para Windows; SPSS Chicago, Ill). Las diferencias se compararon usando el test de la U de Mann-Whitney con corrección post-hoc de Bonferroni. Se calcularon coeficientes de correlación de Spearman para estimar las correlaciones lineales entre variables y el intervalo de confianza fue de un 95%.

Se hizo un análisis de regresión múltiple para evaluar los efectos de los parámetros del síndrome metabólico en los marcadores de expresión relativa; las variables independientes que se correlacionaron significativamente con estos marcadores en el análisis univariante se incluyeron en el modelo. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $P < 0,05$. Las figuras se realizaron con GraphPadPrisma (GraphPad Software Inc.versión 5.01 para Windows. La Jolla, California).

RESULTADOS

1. Características clínicas

Se seleccionaron 92 sujetos consecutivamente de los cuales 71 fueron clasificados como NPMS (30 de ellos varones y 41 mujeres) y 21 como NPME (9 varones y 12 mujeres).

La edad media fue de $48,33 \pm 14$ años en el momento de la cirugía siendo de $45,41 \pm 12,27$ para varones y $50,47 \pm 14,91$ para mujeres, no existiendo diferencias significativas entre ambos ($P > 0,05$). Y de $46,87 \pm 13,44$ años en NPMS y de $53,24 \pm 15,09$ en NPME sin existir diferencias significativas ($P > 0,05$).

2. Características antropométricas y bioquímicas de los pacientes.

La tabla 7 muestra los parámetros antropométricos y bioquímicos de los pacientes con o sin síndrome metabólico. Los sujetos elegidos mostraron un IMC acorde a su estado de normopeso, sin diferencias significativas entre grupos. Los pacientes NPME mostraban síntomas claros de síndrome metabólico. Por ejemplo, aunque tenían un IMC normal, tenían mayores cifras de glucemia, TG, proteína C reactiva (PCR), colesterol total y colesterol LDL y mayor circunferencia abdominal y niveles inferiores de colesterol HDL. Además, estos pacientes presentaban también mayores niveles de insulina y HOMA-IR.

	NPMS	NPME	Valor P
Peso (kg)	65,3±8,84	64,9±5,97	0,850
Altura (cm)	166,7±10,22	164±7,14	0,258
IMC (kg/m ²)	23,40 ± 1,30	23,81 ± 1,12	0,124
TAS (mmHg)	119,77±20,754	129,14 ± 17,48	0,064
TAD (mmHg)	75,2±13,15	79,9 ± 8,75	0,128
Cadera (cm)	94,44 ± 8,47	96,76 ± 4,38	0,230
Cintura (cm)	82,30 ± 7,91	90,10 ± 5,29	< 0,001
Cintura/Cadera	0,86 ± 0,08	0,92 ± 0,04	0,068
Glucosa (mg/dl)	89,80 ± 11,36	101,24 ± 10,445	< 0,001
Insulina (μU/ml)	7,89 ± 4,98	10,41 ± 4,94	0,047
Péptido C (ng/ml)	1,92 ± 0,72	2,38 ± 0,558	0,017
HOMA-IR	1,76 ± 1,24	2,60 ± 1,29	0,009
Urea (mg/dl)	31,74 ± 9,32	31,36 ± 7,33	0,891
Creatinina (mg/dl)	0,81 ± 0,19	0,93 ± 0,26	0,061
Ácido úrico (mg/dl)	4,02 ± 1,06	4,70 ± 1,31	0,017
Colesterol (mg/dl)	202,87 ± 40,39	226,19 ± 32,82	0,018
c-HDL (mg/dl)	59,10 ± 13,88	45,14 ± 8,32	< 0,001
c-LDL (mg/dl)	124,61 ± 32,79	145,59 ± 29,52	0,010
TG (mg/dl)	87,85 ± 40,66	184,86 ± 73,13	< 0,001
GOT (mU/ml)	18,32 ± 7,12	23,52 ± 18,25	0,052
GPT (mU/ml)	32,38±12,06	48 ± 36,18	0,002
GGT (mU/ml)	30,79±29,03	120,10 ± 324,36	0,023
Ferritina (ng/ml)	53,46±58,29	79,92 ± 83,77	0,250
Transferrina (mg/dl)	266,5789±49,23942	279,36 ± 48,33	0,408
Hierro (μg/dl)	93,1842±46,13075	85,29 ± 27,06	0,550
HbA1c (%)	5,44±0,39	5,82±0,61	< 0,001
ApoA1 (mg/dl)	177,14±30,55	159,86±20,26	0,056
ApoB (mg/dl)	95,62±28,42	125,95±26,5	< 0,001
ApoB/ApoA	0,55±0,18	0,8±0,20	< 0,001
Calcio (mg/dl)	9±0,32	8,91±0,25	0,332
Fósforo (mg/dl)	3,31±0,62	3,6±0,39	0,105
PCR (mg/dl)	3,4±2,62	9,02±22,98	0,058

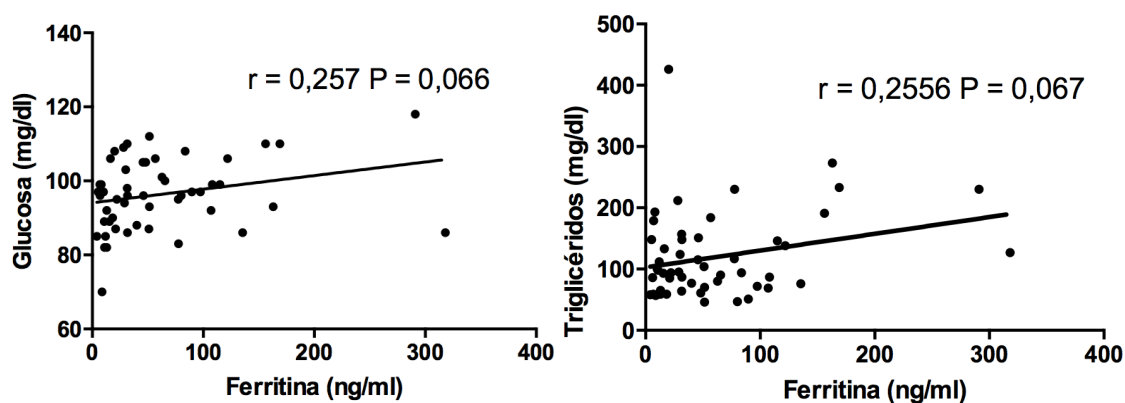


	NPMS	NPME	Valor P
Leptina (ng/ml)	10,14±12,99	22,25±18,5	0,051
Adiponectina (µg/ml)	19,11±13,72	12,4±7,3	0,224
Osteocalcina (ng/ml)	7,14±5,4	6,69±5,01	0,822
PTH (pg/ml)	54,61±24	58,54±23,66	0,667
25OH Vitamina D3 (ng/ml)	42,23±16,78	26,06±10,22	0,007

Tabla 7.- Variables antropométricas y bioquímicas del NPMS y NPME

3. Marcadores bioquímicos plasmáticos y su asociación con el síndrome metabólico

Dentro de los parámetros bioquímicos evaluados en nuestro estudio se encuentran los relativos al metabolismo del hierro: ferritina, transferrina y hierro plasmático. Dentro de ellos, el marcador que ofrece mayor estabilidad y que refleja los depósitos tisulares de este elemento es la ferritina. En la figura 14 se presentan las correlaciones de esta proteína con parámetros bioquímicos relacionados con el síndrome metabólico. Observamos cómo la ferritina se correlaciona positivamente con los niveles de glucosa y TG, aunque no se alcanzó la significación estadística. Sí se observa significación estadística en la correlación positiva existente entre ácido úrico y ferritina. Tras el análisis de regresión múltiple por pasos persistió esta significación, siendo la ferritina y la cintura las que explican los niveles de ácido úrico (tabla 8).



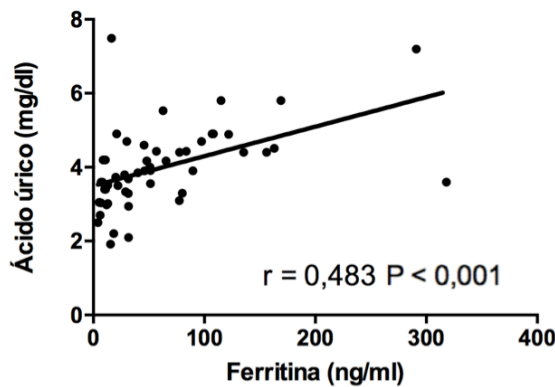


Figura 14.- Correlaciones entre ferritina y otros parámetros bioquímicos

Ácido úrico ($R = 0,604$; $R^2 = 0,365$)				
	β	P	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Ferritina	0,008	< 0,001	0,004	0,12
Perímetro de cintura	0,054	0,001	0,023	0,084

Tabla 8.- análisis de regresión múltiple. Variables independientes: ferritina, perímetro de cintura. Variable dependiente: ácido úrico

4. Medidas de los macrófagos del tejido adiposo y su asociación con el síndrome metabólico

Ninguna medida aislada describe totalmente la heterogenicidad de los MTAs de una muestra de tejido adiposo, por tanto se necesita medir diferentes marcadores. De esta manera, desarrollamos un análisis de medida de expresión de mRNA en un set de genes implicados típicamente en MTA en muestras de TASC y TAV de sujetos con normopeso con y sin síndrome metabólico. Los MTAs se evaluaron midiendo la expresión relativa de mRNA de CD68, EMR1, ITGAM, CD163 y CD33, que son marcadores específicos localizados en la superficie de macrófagos y monocitos (figura 15)

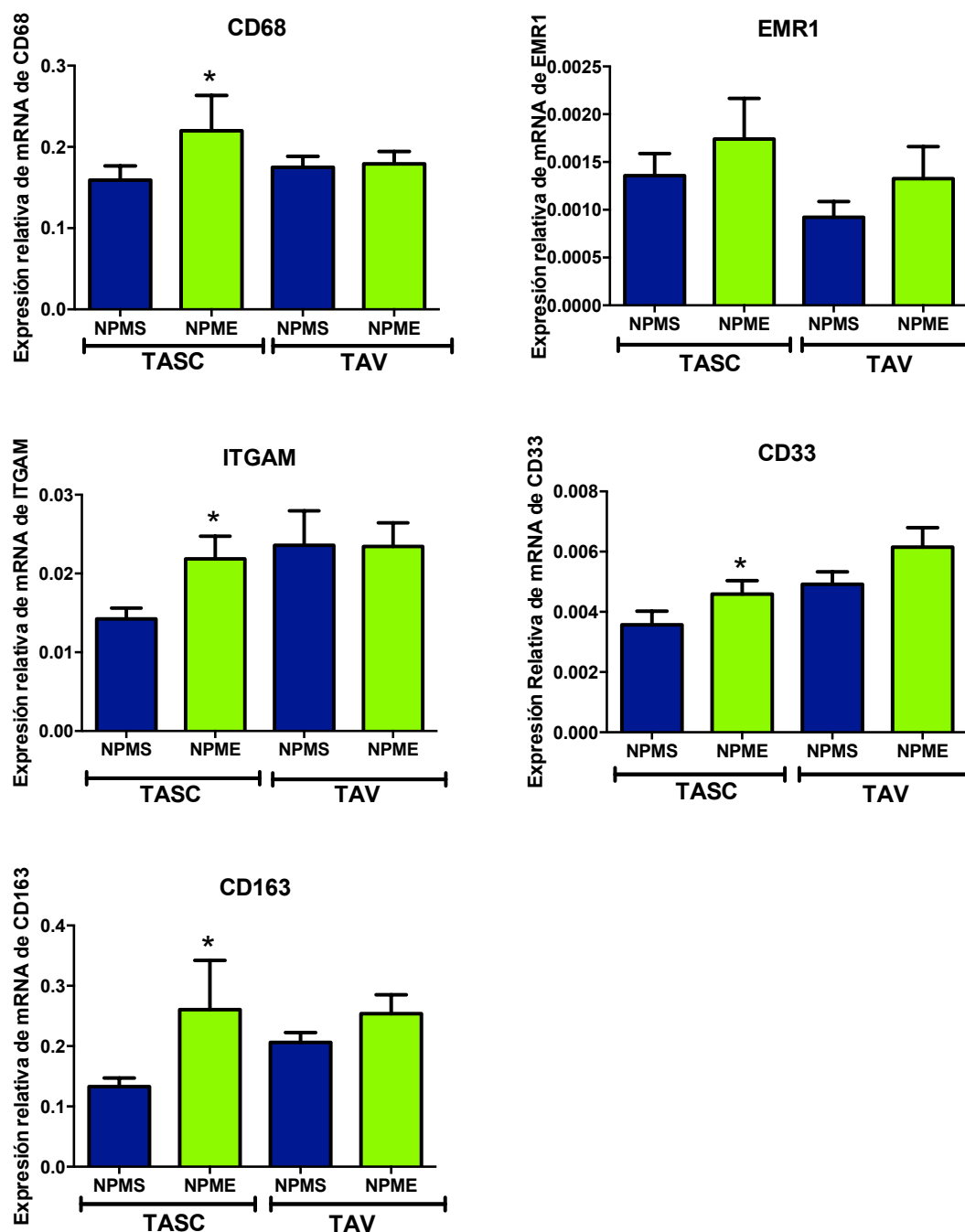


Figura 15.- Niveles de expresión de genes de marcadores de monocitos / macrófagos en TASC y TAV en NPMS (en azul) y NPME (en verde). * Grupos significativamente diferentes ($P < 0,05$).

La figura 15 muestra que la expresión de mRNA en el TASC de los pacientes enfermos difiere de los sujetos sanos. En particular, CD68, CD33, CD163 e ITGAM difieren ($P < 0,05$) entre sujetos NPMS y NPME. Sin embargo, no se encontraron estas diferencias en EMR1. Estos marcadores de

macrófagos / monocitos estaban estimulados en los NPME, indicando una mayor infiltración de macrófagos / monocitos en el TASC.

Una vez se establecieron las diferencias entre ambos tipos de tejido adiposo, se midieron otros marcadores para analizar mejor la naturaleza de estas diferencias. Los niveles de expresión relativa de mRNA de MerTK y CD64 se midieron como marcadores más seguros de MTAs residentes de tejido adiposo²⁰⁹.

La expresión de niveles de MerTK fue mayor en el TASC de pacientes NPME. Los CD64 siguieron esta tendencia sin encontrarse diferencias significativas (Figura 16).

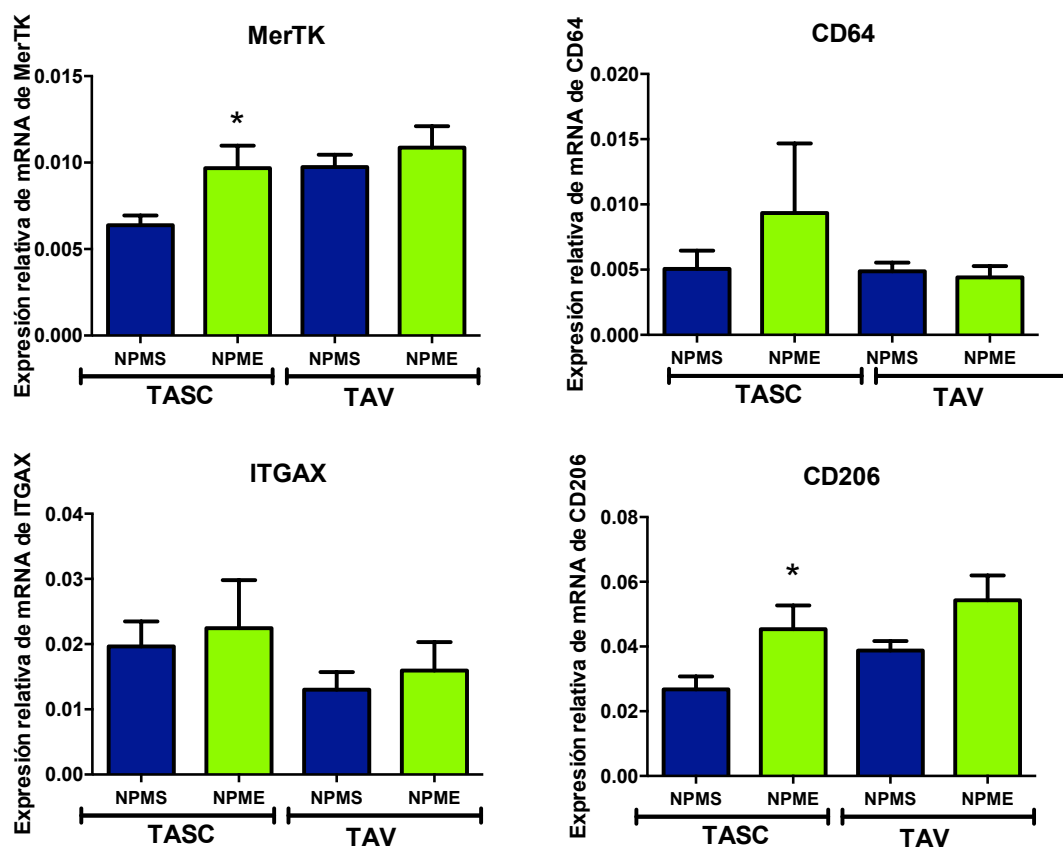
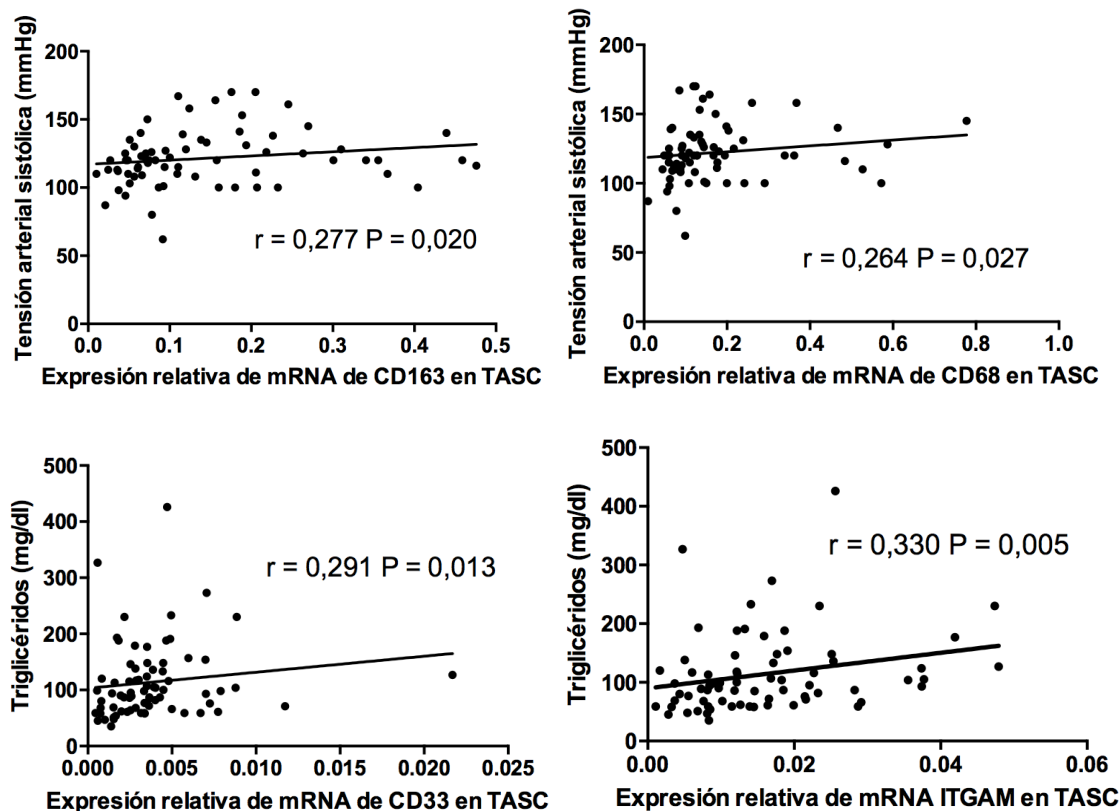


Figura 16.- Niveles de expresión de mRNA de genes y marcadores de polarización de monocitos / macrófagos residentes del TASC y TAV en NPMS (en azul) y NPME (en verde). * Grupos significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Se evaluó la polarización de los MTAs mediante la medición de la expresión relativa de mRNA de ITGAX (M1) y CD206 (M2) (Figura 16). Se detectó mayor expresión de CD206 en los pacientes NPME en el TASC, mientras que no se observaron diferencias entre ambos grupos con respecto al marcador M1, lo que indicaría la naturaleza M2 de los macrófagos residentes en el TASC.

Por otro lado, el TAV parecía no verse prácticamente afectado, como se puede observar en las figuras 15 y 16. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los sujetos NPMS y NPME en este tejido.

Cuando estos niveles de expresión se enfrentaron con los parámetros del síndrome metabólico (figura 17), el CD33 se asoció negativamente con el nivel de c-HDL ($r = -0.241$; $P < 0,05$), al igual que CD68 ($r = -0,376$; $P < 0,01$) e ITGAM ($r = -0.278$, $P < 0,05$); mientras que el CD163 y CD68 se asociaron positivamente con la presión arterial sistólica ($r = 0,277$, $P < 0,05$; $r = 0,264$, $P < 0,05$, respectivamente).



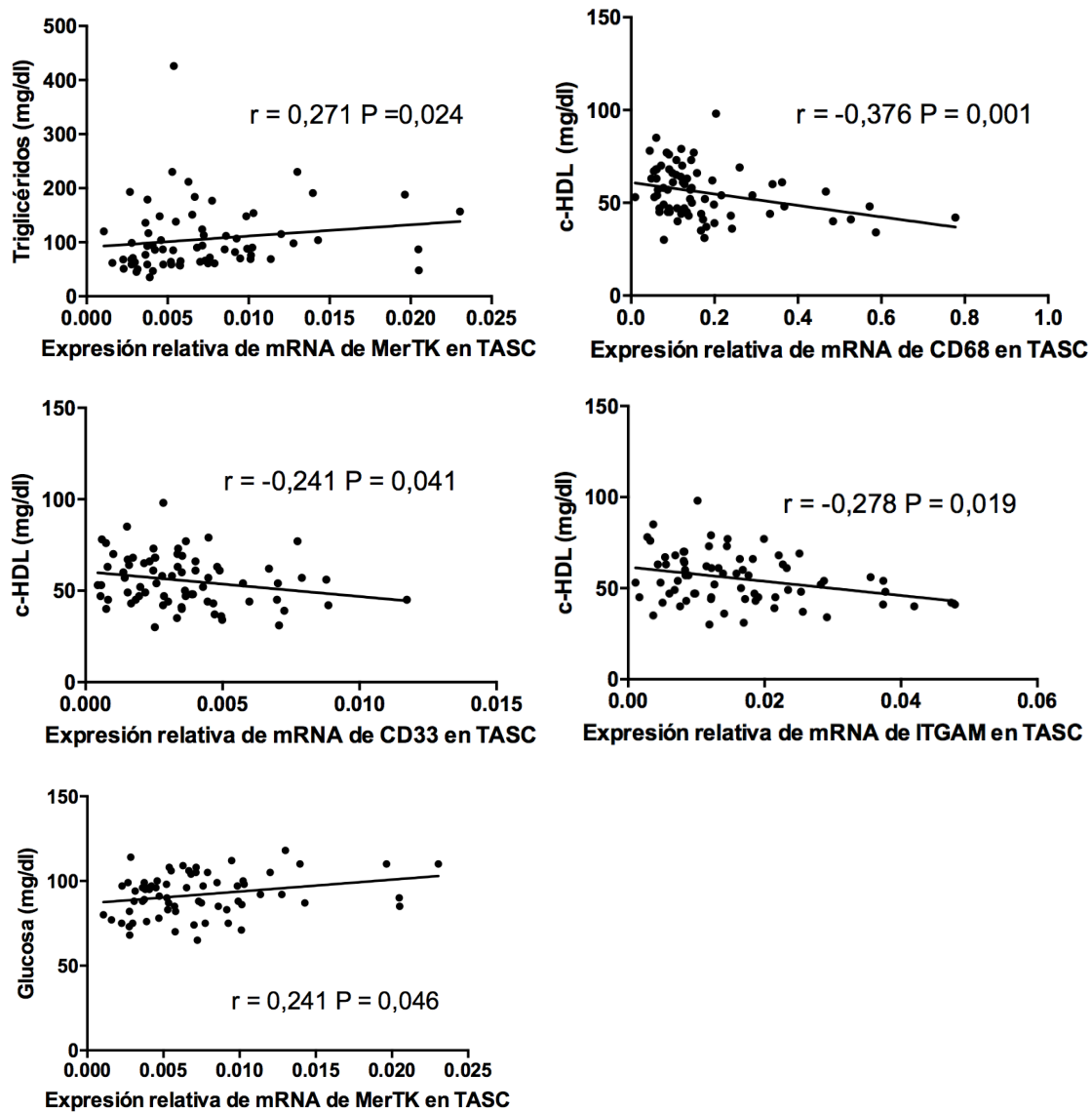


Figura 17.- Correlaciones de marcadores de expresión genética de monocitos / macrófagos en TASC y TAV en relación con parámetros de síndrome metabólico

Los TG se asociaron positivamente con la expresión de CD33 ($r = 0,291$; $P < 0,05$), ITGAM ($r = 0,330$, $P < 0,05$) y MerTK ($r = 0,271$, $P < 0,05$). Además, la glucosa se relacionó con MerTK ($r = 0,241$; $P < 0,05$).

Cuando se enfrentaron los niveles de expresión génica de estos macrófagos / monocitos, las relaciones que surgieron estaban en la misma dirección que en el TASC, lo que sería indicativo de la naturaleza de los marcadores utilizados.

La tabla 9 muestra las relaciones entre las expresiones relativas de genes de macrófagos / monocitos medidas en TASC. En general observamos cómo los marcadores de monocitos / macrófagos (CD68, CD33 y CD163) se correlacionan positivamente entre sí ($P < 0,05$), lo que demuestra la similitud de estos marcadores. Sin embargo, EMR1 no siguió esta tendencia, probablemente debido a la baja cantidad de este marcador en comparación con los demás. Observamos también correlación entre los marcadores de inflamación entre sí (TNF α e IL-6) al igual que ocurre entre los marcadores de adipogénesis (PPAR γ y FABP4), no objetivando esta relación entre ambos grupos. Evidenciamos una correlación negativa entre marcadores adipogénicos y algunos marcadores de monocitos / macrófagos, fundamentalmente con CD68, y en el caso de CD33 sólo con PPAR γ .

TASC	CD68	EMR1	ITGAM	CD33	CD163	TNF α	IL-6	PPAR γ
EMR1	NS							
CD33	0,644 **	NS	0,712 **					
CD163	0,736**	NS	0,545 **	0,616 **				
TNF α	0,300 **	NS	0,280*	NS	0,349 **			
IL-6	NS	NS	NS	NS	NS	0,553**		
PPAR γ	-0,279 **	NS	NS	-0,307 **	NS	NS	NS	
FABP4	-0,253 **	NS	-0,261 *	NS	NS	NS	NS	0,290**

Tabla 9.- Correlaciones entre las expresiones relativas de genes de macrófagos / monocitos medidas en TASC. * Indica diferencia entre grupos ($P < 0,05$); ** indica diferencias entre los grupos ($P < 0,01$)

Cuando se enfrentaron estos niveles de expresión de los genes de macrófagos / monocitos en TAV, las relaciones que surgieron estaban en la misma dirección que en el TASC, indicativo de la naturaleza de los marcadores utilizados, como puede verse en la Tabla 10. En este caso la correlación de TNF α e IL-6 fue más llamativa con EMR1 y en el caso de PPAR γ y FABP4 con ITGAM. En este tejido, y a diferencia del TASC, sí

Resultados

podimos encontrar una correlación negativa entre TNF α y FABP4, ya que en TASC no se objetivó relación entre marcadores de adipogénesis e inflamación. TNF α fue el que más se relacionó con los macrófagos/monocitos en este tejido, encontrándose significación con todos los marcadores estudiados de este grupo celular.

TAV	CD68	EMR1	ITGAM	CD33	CD163	TNF α	IL-6	PPAR γ
EMR1	NS							
ITGAM	0,731**	0,253*						
CD33	0,699**	NS	0,786**					
CD163	0,747**	NS	0,648*	0,570**				
TNFα	0,301**	0,423**	0,286*	0,235*	0,324**			
IL-6	NS	0,378**	NS	NS	NS	0,424**		
PPARγ	NS	NS	-0,226*	NS	NS	NS	NS	
FABP4	NS	NS	-0,381**	-0,342**	NS	-0,247**	NS	0.628 **

Tabla 10.- relaciones entre las expresiones relativas de genes de macrófagos / monocitos medidas en TAV. * Indica diferencias entre grupos ($P < 0,05$); ** indica diferencias entre grupos ($P < 0,01$)

Si bien cuando se enfrentaron los niveles de expresión de estos genes medidos en el TAV con los parámetros de síndrome metabólico, se encontró una relación negativa entre EMR1 y c-HDL ($r = -0,265$; $P < 0,05$); mientras que entre CD163 y CD68 y la presión arterial sistólica ($r = 0,243$, $P < 0,05$; $r = 0,252$, $P < 0,05$, respectivamente), se encontraron relaciones positivas, como ya se observó en el TASC. Por otra parte, CD206 estaba relacionado con los TG ($r = 0,233$; $P < 0,05$) y la circunferencia de la cintura ($r = 0,240$; $P < 0,05$) (Figura 18).

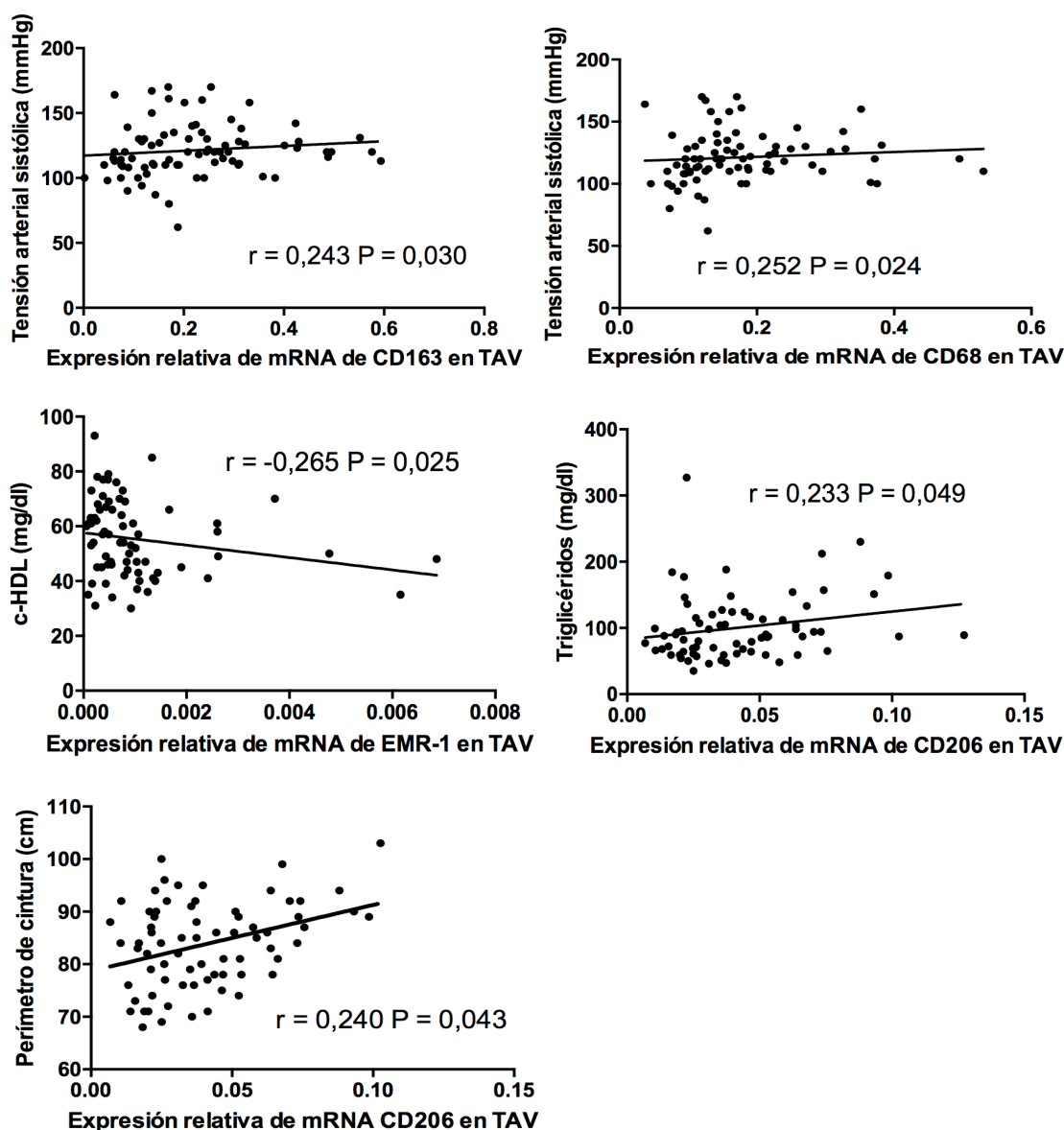


Figura 18.- Correlaciones significativas de marcadores de expresión génica de monocitos / macrófagos en TAV en relación con parámetros de síndrome metabólico

5. Medidas de citoquinas inflamatorias y su asociación con el síndrome metabólico.

Para evaluar el nivel de inflamación del tejido adiposo, se midió la expresión relativa de mRNA de las citoquinas proinflamatorias clásicas: TNF α e IL-6 (figura 19). Aunque ambas citoquinas parecían estar aumentadas en el paciente NPME, no se vieron afectadas significativamente ($p < 0,05$).

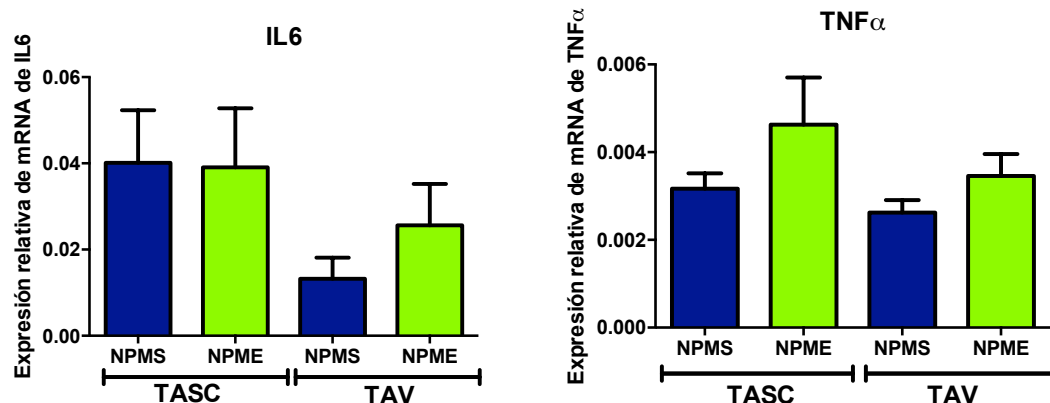


Figura 19.- Expresión relativa de niveles de mRNA de citoquinas proinflamatorias en TASC y TAV en NPMS (en azul) y NPME (en verde)

Si bien, se encontró una relación positiva entre los niveles de expresión de TNFα e IL-6 tanto en TASC como TAV (figura 20). Así, el TAV parecía ser el tejido más estrechamente relacionado con la inflamación, y el TNFα fue el marcador que estuvo más implicado.

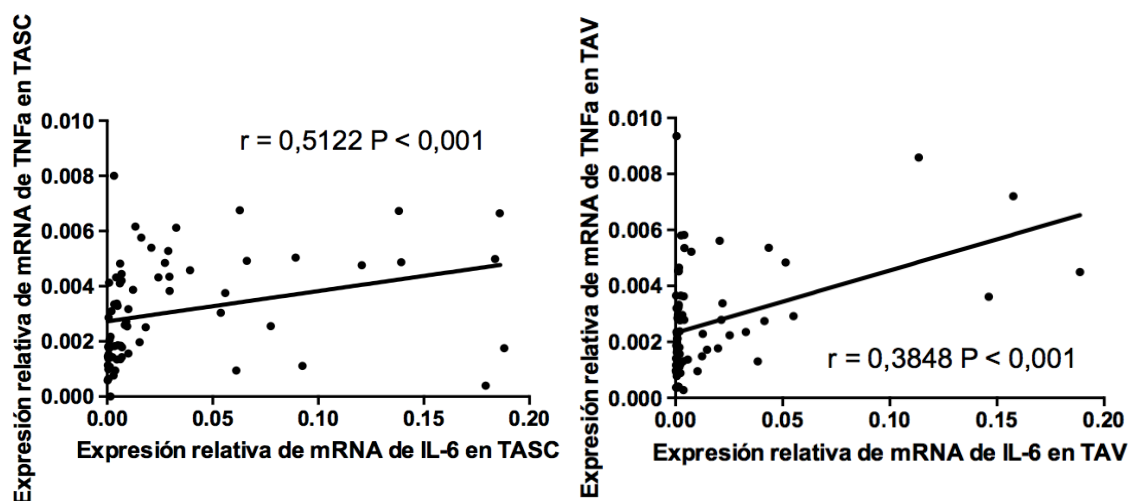


Figura 20.- Correlación entre los niveles de expresión de TNFα e IL-6 en TASC y TAV

Cuando los niveles de estas citoquinas se compararon con los parámetros del síndrome metabólico (Figura 21), se encontraron algunas correlaciones significativas débilmente. El TNFα se correlacionó positivamente con la presión arterial sistólica ($r = 0,288$, $P < 0,05$) y la IL-6 se correlacionó con el c-HDL ($r = -0,326$; $P < 0,05$) y los TG ($r = 0,251$; $P < 0,05$) en TAV.

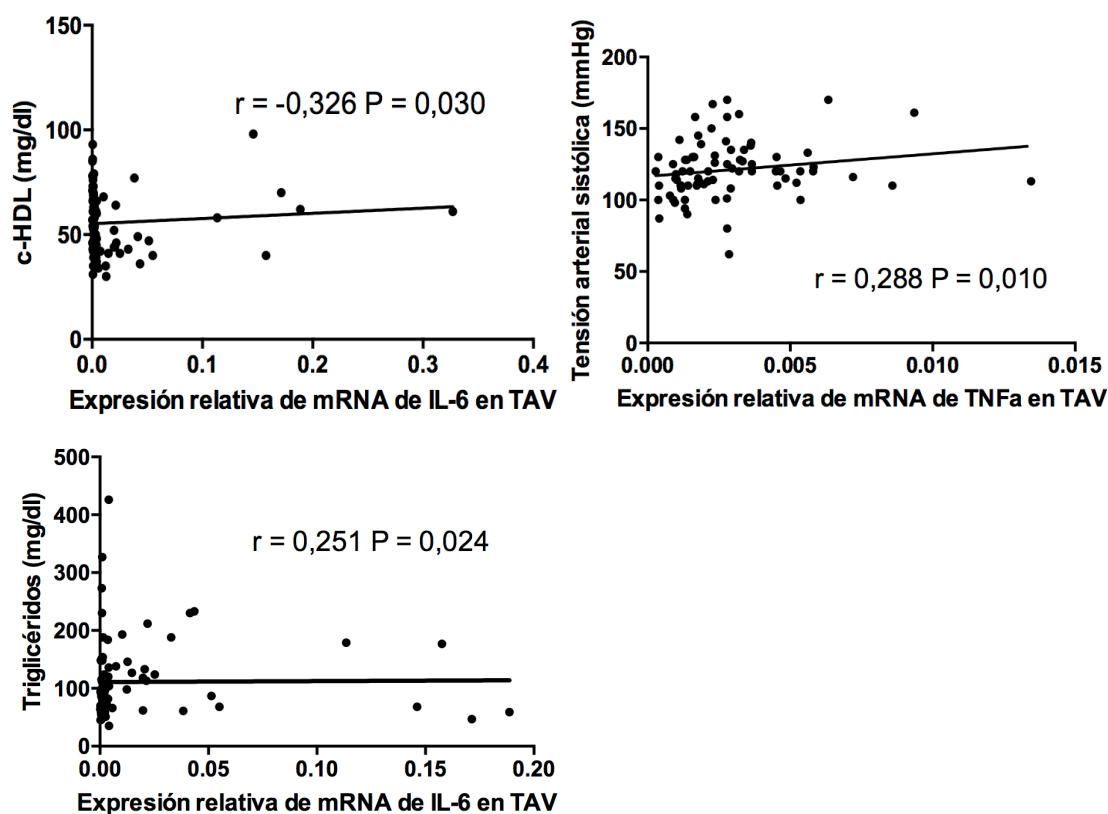


Figura 21.- Correlaciones de expresión génica de citoquinas proinflamatorias en TASC y TAV en relación con parámetros de síndrome metabólico

Dada la falta de información obtenida con los marcadores de inflamación clásicos, se midieron otros mediadores de la inflamación en el tejido adiposo. Se evaluó la expresión relativa de mRNA de IL-10, IL-1b, CCL2, CCL3 (figura 22). Una vez más, no hubo diferencias significativas en el TASC y el TAV ($P > 0,05$), aunque es importante mencionar el bajo nivel de estos marcadores en los pacientes NPME en el TAV, otro indicativo de la importancia del TASC en el comienzo de la enfermedad. Estos marcadores de inflamación se correlacionan positivamente entre sí, lo que indicaría su relación.

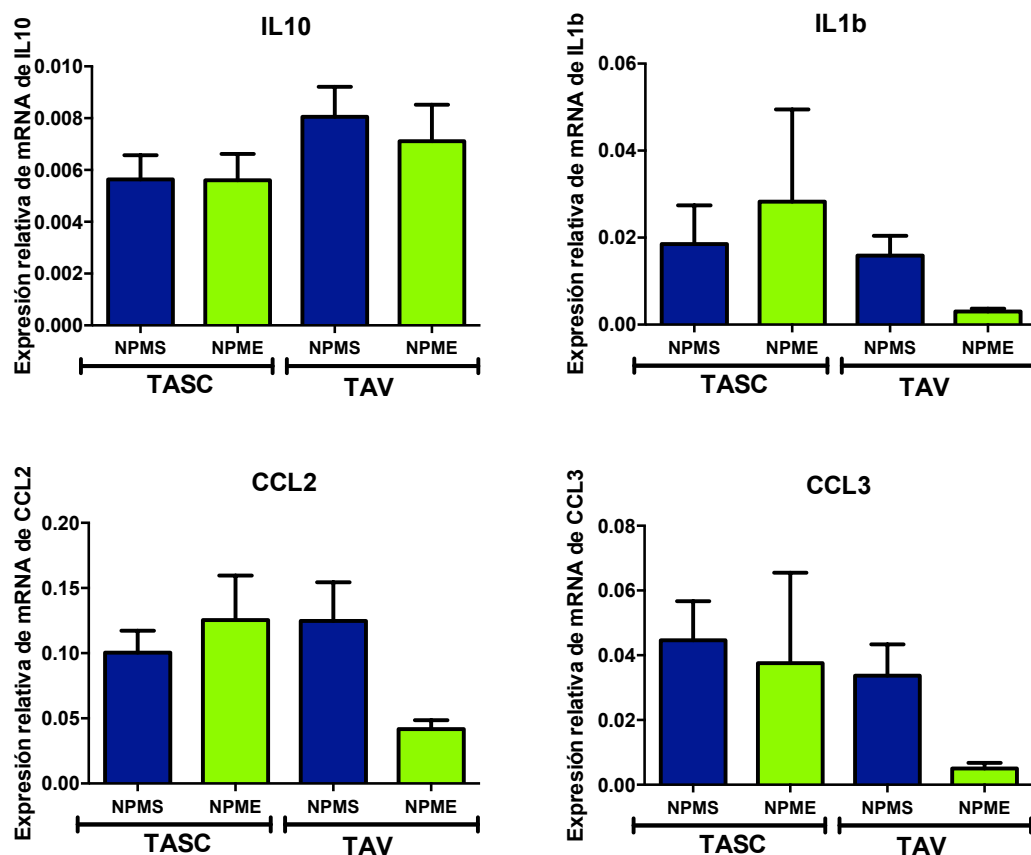


Figura 22.- Niveles de expresión relativa de mRNA de genes de mediadores inflamatorios en TASC y TAV en NPMS (en azul) y NPME (en verde)

En las siguientes tablas se muestran las correlaciones estudiadas entre los mediadores de la inflamación descritos previamente y marcadores inespecíficos de monocitos / macrófagos (CD64 y MerTK) así como más específicos de macrófagos M1 (ITGAX) y M2 (CD206)

En la tabla 11 se valoraron las relaciones de estos parámetros en el tejido subcutáneo, encontrándose una correlación positiva de todos los mediadores de la inflamación entre sí. CD206 se correlacionó positivamente con todos los parámetros analizados con excepción de IL-1b e ITGAX, lo cual tendría sentido ya que, al contrario de CD206, estos guardan más relación con un estado proinflamatorio. De la misma manera no se encontraron relaciones entre ITGAX e IL-10, ambas implicadas en procesos opuestos. MerTK sólo se correlacionó positivamente con CD206 e IL-10.

TASC	CCL2	CCL3	CD206	CD64	IL-10	IL-1b	ITGAX
TASC							
CCL3	0,590**						
CD206	0,314**	0,314**					
CD64	0,339**	0,430**	0,429**				
IL-10	0,480**	0,621**	0,603**	0,457**			
IL-1b	0,648**	0,621**	NS	0,553**	0,425**		
ITGAX	NS	0,377**	NS	0,440**	NS	0,326**	
MerTK	NS	NS	0,426**	NS	0,428*	NS	NS

Tabla 11.- Correlaciones entre mediadores de la inflamación y marcadores de monocitos / macrófagos en el TASC. * Indica diferencias entre grupos ($P < 0,05$); ** indica diferencias entre grupos ($P < 0,01$)

Se analizaron posteriormente las relaciones de estos parámetros entre los dos tipos de tejidos adiposos estudiados (tabla 12). Hubo correlación positiva estadísticamente significativa en la expresión relativa de mRNA de cada parámetro en TASC y TAV de todos ellos excepto de CD206 e ITGAX. CD206 en TASC presentó una correlación positiva con IL-1b en TAV, no encontrándose otras correlaciones de CD206 en ninguno de los tejidos. De la misma manera, sólo se encontró relación positiva de la expresión de MerTK en TASC.

TAV	CCL2	CCL3	CD206	CD64	IL-10	IL-1b	ITGAX	MERTK
TASC								
CCL2	0,551**	0,533**	NS	0,375**	0,536**	0,464**	0,334**	NS
CCL3	0,465**	0,561**	NS	0,352*	0,358**	0,480**	0,273*	0,275*
CD206	NS	NS	NS	NS	NS	0,302*	NS	NS
CD64	0,391**	0,341*	NS	0,413**	NS	0,415**	NS	NS
IL-10	0,398**	0,431**	NS	0,348*	0,320*	0,434**	0,303*	0,328*
IL-1b	0,471**	0,488**	NS	0,396**	0,352*	0,498**	0,277*	NS
ITGAX	0,324*	NS	NS	NS	NS	0,312*	NS	NS
MerTK	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,384**

Tabla 12.- Correlaciones de mediadores de la inflamación y marcadores de monocitos / macrófagos entre TASC y TAV. * Indica diferencias entre grupos ($P < 0,05$); ** indica diferencias entre grupos ($P < 0,01$)

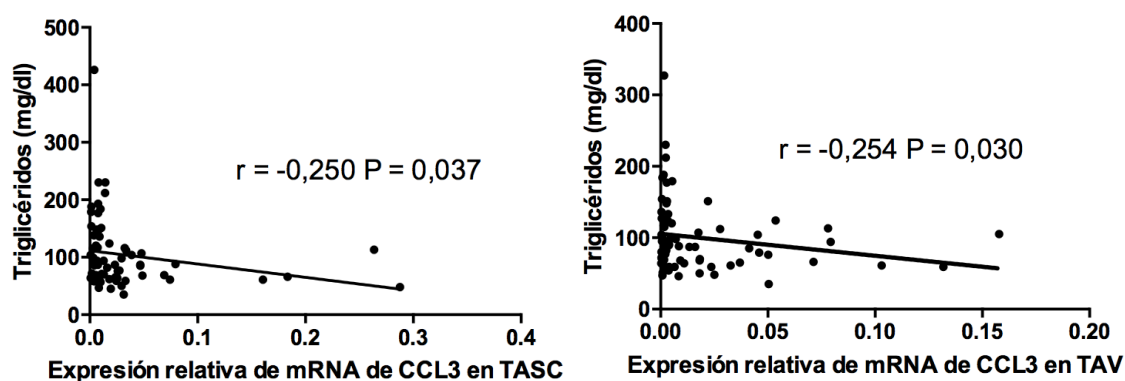
Resultados

En la tabla 13 se analizan estas mismas correlaciones dentro del TAV, siendo todas ellas positivas y estadísticamente significativas excepto CD206 con CCL3 e IL-1b y de MerTK con CCL3, CD64 e IL-1b.

TAV	CCL2	CCL3	CD206	CD64	IL-10	IL-1b	ITGAX
TAV							
CCL3	0,765**						
CD206	0,400**	NS					
CD64	0,607**	0,546**	0,344**				
IL-10	0,751**	0,689**	0,481**	0,627**			
IL-1b	0,711**	0,825**	NS	0,539**	0,642**		
ITGAX	0,394**	0,433**	0,321**	0,421**	0,471**	0,469**	
MerTK	0,328**	NS	0,556**	NS	0,534**	NS	0,396**

Tabla 13.- Correlaciones entre mediadores de la inflamación y marcadores de monocitos / macrófagos en TAV. * Indica diferencias entre grupos ($P < 0,05$); ** indica diferencias entre grupos ($P < 0,01$)

Al comparar los niveles de estas citoquinas con los marcadores de síndrome metabólico como se puede observar en la figura 23, CCL3 se correlacionó con los TG en el TASC y TAV ($r = -0,250$, $P < 0,05$; $r = -0,254$; $P < 0,05$, respectivamente) y con la glucosa en el TAV ($r = -0,275$; $P < 0,05$).



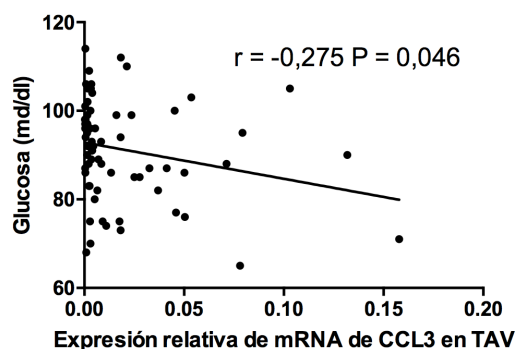


Figura 23.- Correlaciones significativas de expresión génica de mediadores inflamatorios en TASC y TAV en relación con parámetros de síndrome metabólico

6. Lipogénesis, adipogénesis y sus asociaciones con el síndrome metabólico.

La adipogénesis y la función lipogénica se evaluaron mediante la expresión relativa de mRNA de PPAR γ y FABP4 (figura 24), ya que estas son dos moléculas muy activas en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos en el tejido adiposo.

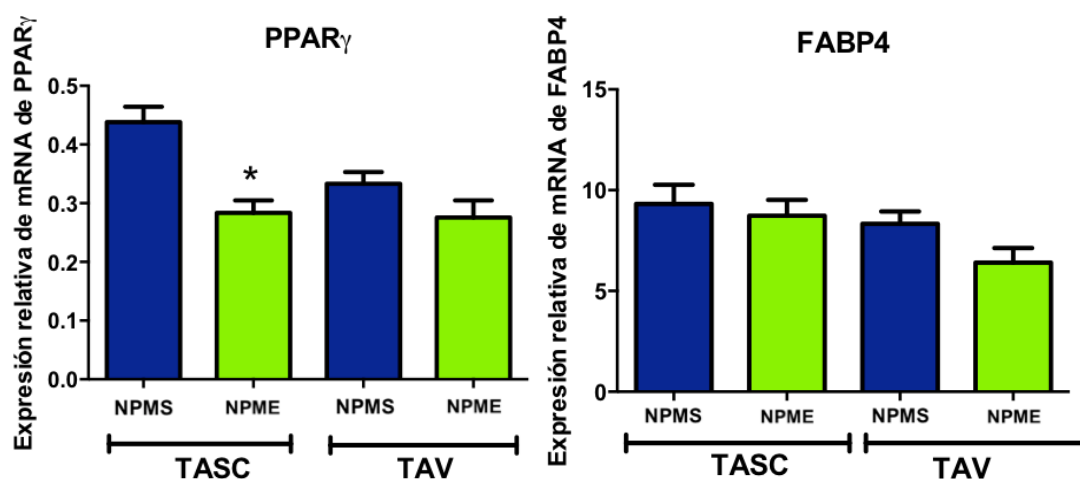


Figura 24.- Niveles de expresión relativa de mRNA de marcadores de adipogénesis en TASC y TAV en NPMS (en azul) y NPME (en verde). * Grupos significativamente diferentes ($P < 0,05$)

El PPAR γ en el TASC de sujetos NPME se inhibe ($P < 0,001$), mientras que en el TAV no se observaron diferencias ($P > 0,05$). No se

detectaron diferencias entre los grupos de estudio para FABP4.

Se encontraron relaciones entre los dos marcadores utilizados, PPAR γ y FABP4, presentando una correlación positiva entre ellas en ambos tejidos. Por otra parte, ambos marcadores en el TASC presentan una correlación negativa ($P < 0,05$) con CD68 y CD33, mientras que en el TAV esta relación negativa se vio con ITGAM y CD33 (tabla 9 y 10).

PPAR γ se asoció con algunos de los parámetros del síndrome metabólico (Figura 25) y mostró una correlación negativa con los triglicéridos ($r = -0,309$; $P < 0,01$) y una correlación positiva con el c-HDL ($r = 0,433$ $P < 0,01$).

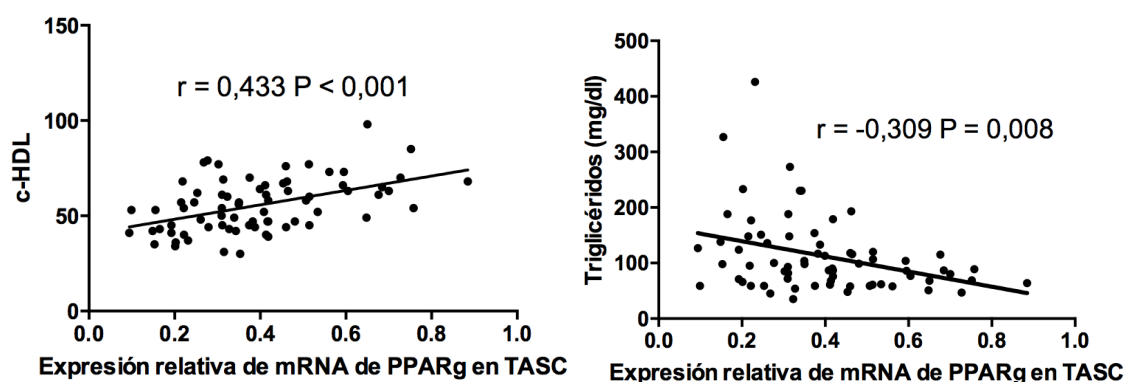


Figura 25.- Correlaciones significativas encontradas entre expresión de marcadores de adipogénesis y parámetros de síndrome metabólico

7. Marcadores de adipogénesis en cultivos celulares diferenciados en medios adipogénicos.

Con el fin de evaluar el impacto del síndrome metabólico sobre la adipogénesis, se aislaron y expandieron las fracciones vasculares del estroma celular de muestras del TASC y TAV, diferenciadas en medios adipogénicos. Tal y como se ha comentado anteriormente, los pacientes utilizados para este propósito fueron diferentes a los usados en el estudio anterior, debido a la falta de la cantidad necesaria de tejido para este fin.

Así, las características de los sujetos utilizados para el estudio de diferenciación adipogénica se muestran en la tabla 14. A pesar de que los pacientes utilizados en esta parte del experimento estarían clasificados como sobrepeso ($IMC < 30$) debido a la falta de disponibilidad de tejido adiposo en normopeso, no hubo diferencias significativas en el IMC. Los sujetos con enfermedad metabólica presentaron mayor glucemia basal y presentaban, aunque sin alcanzar significación estadística, una tendencia a presentar un HOMA-IR superior. En el resto de parámetros tampoco se encontraron diferencias significativas entre grupos.

	MS	ME	Valor P
n	5	4	-
Edad (años)	35,20 ± 8,20	42,67 ± 12,50	0,423
IMC (kg/m²)	25,03 ± 1,50	26,11 ± 4,26	0,612
Glucosa basal (mg/dL)	96,8 ± 2,28	110,33 ± 3,78	0,001
HOMA-IR	2,04 ± 1,03	4,15 ± 1,17	0,052
Perímetro de cintura (cm)	87,42 ± 12,46	93,02 ± 22,07	0,655
TG (mg/dL)	92,40 ± 40,30	401,67 ± 251,42	0,165
c-HDL (mg/dL)	54,60 ± 17,30	40,40 ± 18,36	0,301
TAD (mmHg)	71,21 ± 15,29	85,00 ± 9,17	0,212
TAS (mmHg)	113,2 ± 22,60	123,33 ± 14,57	0,519

Tabla 14.- variables antropométricas y bioquímicas de MS y ME utilizados para el cultivo celular en medio adipogénicos. MS: metabólicamente sano. ME: metabólicamente enfermo

Las imágenes de las células de los TAV y TASC se presentan en la Figura 26, que muestra cualitativamente la capacidad de diferenciación de las células mesenquimales de tejido adiposo en los diferentes tipo de tejido adiposo (TASC y TAV) y el estado diferente en el síndrome metabólico.

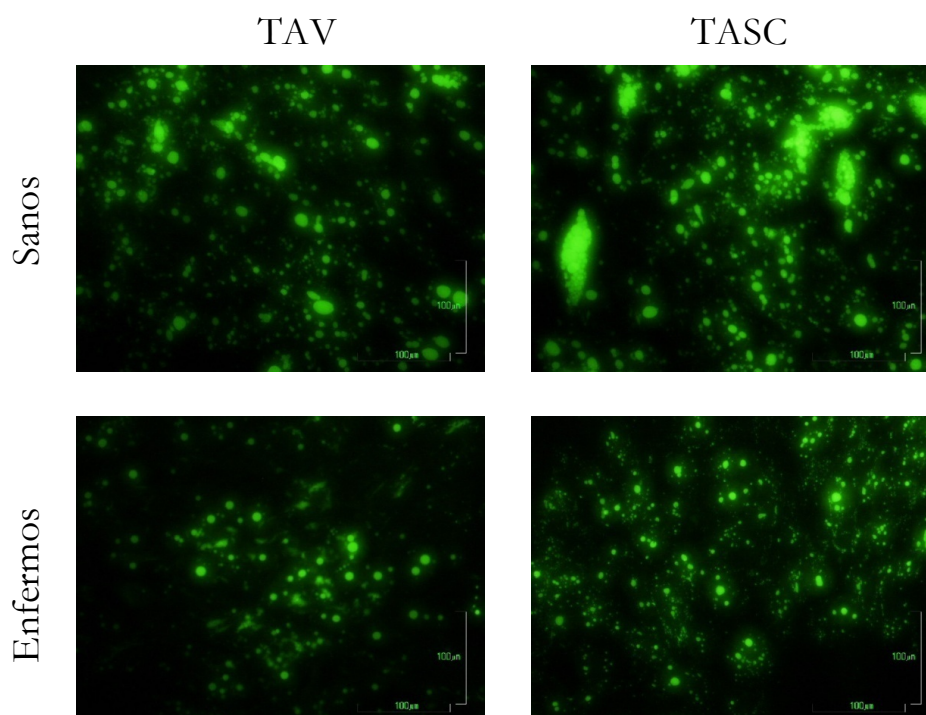


Figura 26.- Fracciones vasculares del estroma vascular de muestras de TASC y TAV diferenciadas en medios adipogénicos

La expresión de mRNA relativa a diferentes genes relacionados con la adipogénesis de estos cultivos fue medida en el día 14, tras su diferenciación en medio adipogénico. Con el fin de evaluar la información más completa, en este experimento se midió una gama más amplia de genes de la adipogénesis, así como PPAR γ y FABP4. El tamaño de muestra fue bajo debido a la dificultad relacionada con la disponibilidad de la muestra, por lo que no se detectaron diferencias significativas, aunque algunas tendencias ($0,1 > P < 0,05$) mostraron en qué dirección iba esta enfermedad (Figura 27).

La expresión de mRNA en relación con la ADRP en el TASC mostró una tendencia ($P = 0,099$), con valores más altos en el MS que en el grupo ME, lo que indica una mayor diferenciación. Del mismo modo, la expresión relativa de mRNA en FABP4 del TASC fue mayor en NPMS ($P = 0,066$), indicando también una mayor adipogénesis. Sin embargo, no se detectaron diferencias o tendencias con respecto a la CEBP α , PPAR γ , LPL o leptina (LEP) ($P > 0,1$).

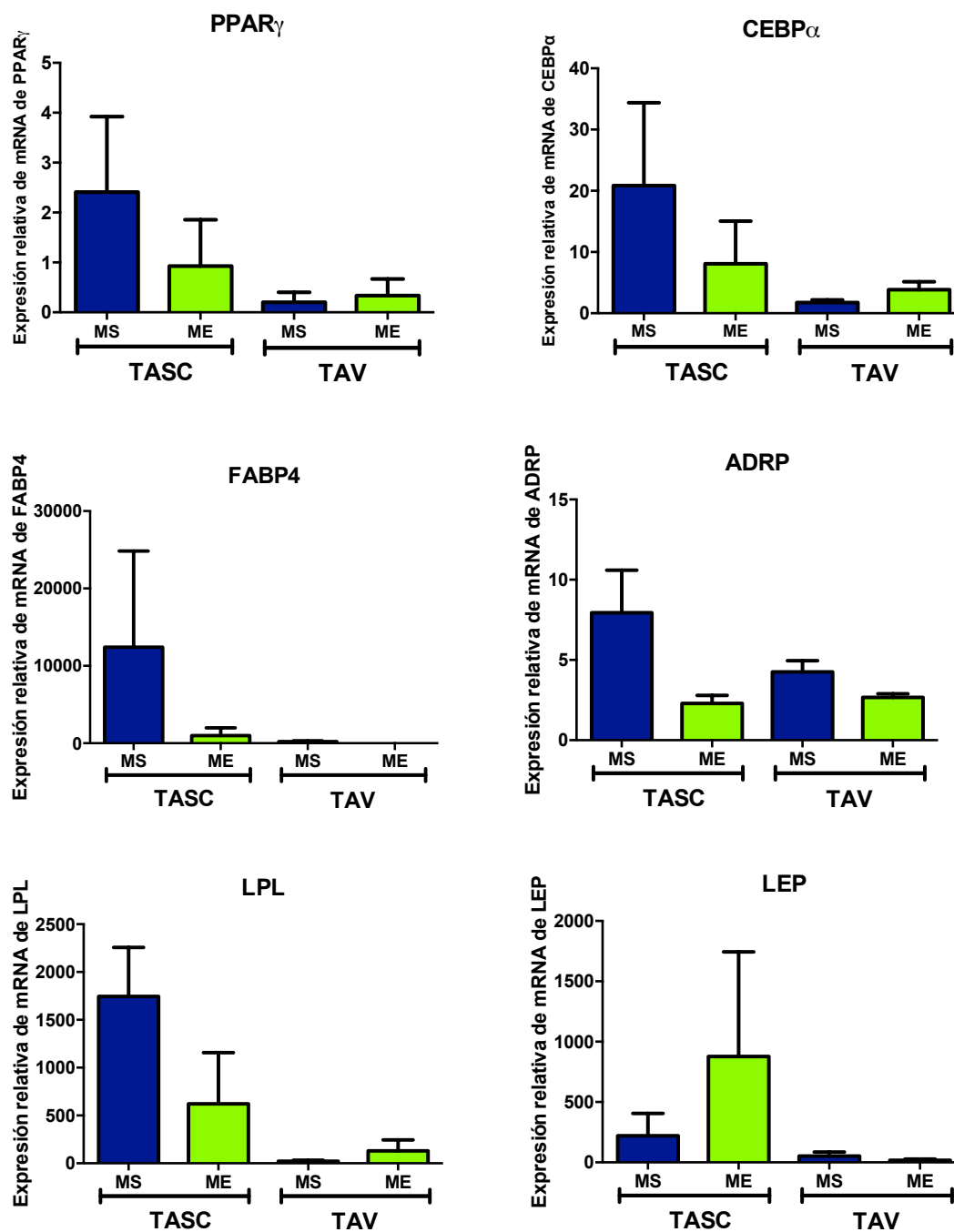


Figura 27.- Expresión relativa de mRNA de genes relacionados con la adipogénesis en cultivos celulares en MS (en azul) y ME (en verde)

8. Citoquinas inflamatorias y marcadores de lipogénesis y adipogénesis en una subpoblación de sujetos sin criterios de síndrome metabólico comparados con sujetos con al menos tres criterios

Por otro lado se realizó un análisis de subgrupos que se muestra en la tabla 15, donde se presentan las características de sujetos que no tenían ningún criterio de síndrome metabólico (NPMS0) comparadas con aquellos que reunían al menos tres criterios del mismo (NPME3), no encontrándose diferencias significativas entre IMC, y difiriendo claramente en las características bioquímicas que definen el síndrome metabólico.

	NPMS0	NPME3	Valor P
n	34	21	-
IMC (kg/m²)	23,14 ± 1,40	23,81 ± 1,12	0,121
Glucosa Basal (mg/dL)	85,85 ± 9,09	101,24 ± 10,45	< 0,001
HOMA-IR	1,40 ± 0,74	2,6 ± 1,29	< 0,001
TG (mg/dL)	71,03 ± 19,73	184,86 ± 73,13	< 0,001
Cadera (cm)	93,44 ± 9,22	96,76 ± 4,38	0,104
Cintura (cm)	80,43 ± 7,18	90,10 ± 5,29	< 0,001
Índice Cintura/Cadera	0,86 ± 0,09	0,92 ± 0,04	0,071
Insulina (μIU/dL)	6,75 ± 3,58	10,41 ± 4,94	0,001
Péptido C (ng/mL)	1,67 ± 0,37	2,38 ± 0,558	< 0,001
Colesterol (mg/dL)	195,62 ± 36,66	226,19 ± 32,82	0,005
c-HDL (mg/dL)	62,94 ± 12,905	45,14 ± 8,32	< 0,001
c-LDL (mg/dL)	115,92 ± 26,29	145,59 ± 29,52	0,001
TAS (mmHg)	110,15 ± 14,195	129,14 ± 17,48	< 0,001
TAD (mmHg)	72,58 ± 13,314	79,9 ± 8,75	0,058

Tabla 15.- Variables antropométricas y bioquímicas en metabólicamente sanos sin ningún indicador de síndrome metabólico (NPMS0) y sujetos de peso normal no saludables que reúnen al menos tres criterios de síndrome metabólico (NPME3).

Se comparó la expresión de mRNA de marcadores inflamatorios en aquellos pacientes NPMS0 con NPME3 (tabla 16). El nivel de expresión de PPAR γ fue superior en el TASC del NPMS0 lo que nos indica que la adipogénesis estaba conservada a este nivel. De igual manera la infiltración por MTAs fue inferior en este tejido.

GEN	Tejido	NPMS0	NPME3	Valor P
PPARγ	TASC	0,4915 \pm 0,2155	0,2682 \pm 0,0796	< 0,001
	TAV	0,3083 \pm 0,1317	0,2728 \pm 0,1378	0,379
TNFα	TASC	0,0035 \pm 0,0031	0,0048 \pm 0,0047	0,299
	TAV	0,0208 \pm 0,0993	0,0032 \pm 0,0022	0,456
CD33	TASC	0,0027 \pm 0,0016	0,0046 \pm 0,0019	0,002
	TAV	0,0052 \pm 0,0039	0,0062 \pm 0,0030	0,327
ITGAM	TASC	0,7272 \pm 3,6343	0,0228 \pm 0,0121	0,475
	TAV	0,0234 \pm 0,0193	0,0240 \pm 0,0137	0,919
EMR1	TASC	0,0087 \pm 0,0370	0,0018 \pm 0,0017	0,491
	TAV	0,0012 \pm 0,0016	0,0013 \pm 0,0015	0,877
CD163	TASC	0,1148 \pm 0,0880	0,2720 \pm 0,3567	0,114
	TAV	0,2143 \pm 0,1551	0,2638 \pm 0,1435	0,278
CD68	TASC	0,1535 \pm 0,1188	0,2330 \pm 0,1871	0,103
	TAV	0,1808 \pm 0,1133	0,1816 \pm 0,0717	0,978
IL-6	TASC	0,0444 \pm 0,1195	0,0940 \pm 0,2537	0,400
	TAV	0,0078 \pm 0,0311	0,0259 \pm 0,0431	0,099
FABP4	TASC	10,2721 \pm 9,3415	8,4757 \pm 3,4051	0,480
	TAV	7,3712 \pm 3,8839	6,6832 \pm 3,2419	0,531

Tabla 16.- Niveles de expresión relativa de mRNA de monocitos / macrófagos en TASC y TAV de NPMS0 y NPME3

9. Variables del síndrome metabólico como parámetros predictivos de los macrófagos del tejido adiposo

Para examinar qué variables del síndrome metabólico son los más relevantes para los MTAs, se analizó el efecto de las variables en el nivel de expresión de mRNA de los marcadores medidos, que se correlacionó significativamente con los parámetros del síndrome metabólico (CD68, CD33, CD163, ITGAM, MerTK, y PPAR γ en el TASC, y EMR1, CD163, CD68 y CD206 en el TAV) por medio de un análisis de regresión múltiple.

Como variables independientes se incluyeron los parámetros relativos al síndrome metabólico (glucosa, perímetro de cintura, TG, c-HDL, presión arterial sistólica y diastólica). El análisis de regresión múltiple (tabla 17) demostró que el colesterol c-HDL y la glucosa fueron factores independientes asociados con la expresión relativa de CD68 en el TASC, y la expresión relativa de PPAR γ en el TASC se relacionó con el c-HDL.

CD68 (R = 0,494; R ² = 0,244)				
	β	P	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Glucosa	-0,004	0,004	-0,007	- 0,001
c-HDL	-0,003	0,019	-0,006	- 0,001

PPAR γ (R = 0,482; R ² = 0,232)				
	β	P	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
c-HDL	0,005	0,005	0,002	0,008

Tabla 17.- Análisis de regresión múltiple. Variables independientes incluidas: glucosa, perímetro de cintura. TG, c-HDL, presión arterial sistólica y diastólica. Variables dependientes: expresión relativa de mRNA de CD68 en TASC, expresión relativa de PPAR γ

DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron los sujetos de peso normal con diferentes grados de síndrome metabólico: sujetos NPME. Los resultados nos proporcionan nuevas pistas en relación a la idea de que los sujetos NPME muestran una disfunción en su tejido adiposo. En especial, nuestros datos proporcionan evidencia de un diferente grado de infiltración de macrófagos entre los distintos tipos de tejido adiposo. Si bien, la mayoría de los estudios actuales se basan en TAV, debido a la infiltración de macrófagos predominante en este tejido²⁹⁰, en este estudio hemos demostrado que en el caso de los sujetos de peso normal con síndrome metabólico, el TAV no se ve afectado, mientras que el TASC se altera con respecto a los sujetos sanos.

De igual manera, también se estudiaron las principales citoquinas proinflamatorias: TNF α e IL-6. A pesar de las diferencias encontradas en la infiltración de macrófagos, la inflamación del tejido adiposo no difirió en las etapas de medición y no se encontraron asociaciones directas entre la infiltración de macrófagos y la inflamación. Por otro lado, nuestros datos también han revelado una alteración en la adipogénesis, observándose una regulación a la baja de los principales genes implicados en el TASC, tanto en el tejido adiposo como en sus células diferenciadas. De esta manera, esta pérdida de función de la adipogénesis podría atribuirse a la infiltración de macrófagos / monocitos por la relación negativa entre los marcadores de adipogénesis y de macrófagos / monocitos.

Aunque la obesidad se caracteriza por una inflamación de bajo grado¹²⁸, se sabe poco acerca del momento en que se inicia esta inflamación. En este estudio, hemos abordado este tema por primera vez desde un punto de vista diferente, centrándonos en los pacientes con peso normal, con diferentes grados de síndrome metabólico. De Lorenzo *et al.* describen a los sujetos de

peso normal "metabólicamente obesos" que representan un subgrupo de individuos que tienen un peso e IMC normales, pero muestran un conjunto de características metabólicas que pueden aumentar la posibilidad de desarrollar el síndrome metabólico²⁴⁵. De hecho, en el caso de estos individuos, la adiposidad en lugar del IMC determina el riesgo metabólico⁴. Y es en este punto en donde las acciones que tienen lugar en el interior del tejido adiposo desempeñan el papel principal en el riesgo de padecer enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

Se sabe que el TAB influye en la salud cardiometabólica del individuo, y por esa razón la exploración de su morfología y funciones tendría el potencial de mejorar nuestra comprensión de las patologías asociadas a la obesidad. De hecho, el uso de los fenotipos discordantes, como son los sujetos con NPME y los individuos ObMS, podría aportar pistas para comprender mejor la relación entre el TAB y el riesgo cardiometabólico, independientemente del peso corporal.

Se sabe que el TAV juega un papel decisivo en el desarrollo de la resistencia a la insulina y la inflamación²⁹¹ y de esta manera se ha planteado la hipótesis de que el aumento del TAV en pacientes ME podría ser una de las causas principales de este aumento en el riesgo cardiometabólico²⁹². Este hecho se puede relacionar en nuestros sujetos de estudio con una circunferencia de cintura mayor en los individuos ME. Sin embargo, otra hipótesis postulada en el ObMS posicionaría a la ubicación del acúmulo de grasa como una explicación para la reducción de riesgo cardiometabólico de estos pacientes²⁹³. Por lo tanto, el foco de interés lo estableceríamos en el TASC, donde el ObMS puede almacenar preferentemente el exceso de grasa^{210,229}.

La presencia de células inmunes en TAB tiene un papel importante en la regulación de la función del tejido adiposo. Por otra parte, la población de

células inmunes en el TAB cambia con la obesidad y la disfunción metabólica²³⁴. Por lo tanto, el estudio de las poblaciones de células inmunes en los diferentes depósitos de TAB aportará ideas adicionales en los sujetos NPME. Actualmente, la mayoría de los estudios están basados en el TAV, ya que la infiltración de macrófagos es predominante en este tejido²⁹⁰. Hasta donde sabemos, la infiltración de macrófagos no se ha examinado en este tipo de sujetos. Por otro lado, se ha encontrado que los individuos ObMS tienen una menor infiltración de macrófagos en el TAV en comparación con los individuos ObME, sin observarse cambios en la infiltración de macrófagos del TASC²¹⁰.

Las alteraciones inflamatorias del tejido adiposo se asocian con un aumento significativo de macrófagos²⁹⁴. Así, los MTAs probablemente interfieran con la función de los adipocitos. Los factores segregados por los macrófagos inducen la inflamación en los adipocitos mediante el estímulo de la transcripción de genes relacionados con la inflamación. Por lo tanto, los MTAs parecen contribuir críticamente a las consecuencias metabólicas adversas del síndrome metabólico¹³⁰. Tradicionalmente, estas consecuencias adversas se han evaluado en el TAV, que es el tejido adiposo más patogénico^{40,41,42,43}, pero nuestros resultados sugieren que en el caso de sujetos con peso normal el objetivo de estudio debería ser el TASC.

De esta manera, en el presente estudio, mostramos que los sujetos NPME presentan una expresión alterada en el mRNA de los MTAs del TASC, lo que indica una mayor cantidad de MTAs en este tejido que en el TAV. Toda la gama de los marcadores de macrófagos / monocitos analizados mostró unos valores más altos medidos en NPME, con excepción de EMR1, que no alcanzó significación estadística. Así, EMR1 parece estar más relacionado con el TAV, observándose una relación directa con los

marcadores inflamatorios (TNF α e IL-6), mientras que este patrón no se observó en el TASC.

La infiltración temprana de monocitos / macrófagos en el TASC experimentada por los sujetos NPME aumentaría los niveles de factores pro-inflamatorios, que pueden facilitar el aumento de la adhesión de los monocitos a los adipocitos, el aumento de la medida global de la infiltración de monocitos / macrófagos en el tejido adiposo y, por tanto, facilitar un ciclo de auto-propagación inflamatoria²⁹⁵. Por otra parte, la mayor participación de macrófagos en el medio inflamatorio se alcanza con la muerte de adipocitos después de la hipertrofia adipocitaria⁵², que es cuando los macrófagos aumentan la secreción de citoquinas²⁹⁶.

Los MTAs son responsables de casi toda la expresión de TNF α del tejido adiposo y de una cantidad significativa de IL-6⁸⁷. A pesar de que en el presente estudio no se observó un aumento significativo de estos marcadores pro-inflamatorios en nuestros sujetos, se observaron algunas tendencias, y mucho más importante, hemos encontrado mayores relaciones de TNF α que de IL-6, siendo la principal relación entre TNF α y los marcadores de macrófagos / monocitos lo que confirmaría esta afirmación.

Este comportamiento también se habría observado en los sujetos ObMS cuyos niveles circulantes, expresión y secreción de adipoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF α son similares a los de los individuos de peso normal, actuando como una técnica de adaptación, lo que sugiere una inmunomodulación efectiva²⁹⁷.

Otro punto importante es la naturaleza de los macrófagos infiltrados. El fenotipo de los macrófagos depende del entorno, facilitando la función inmune y el mantenimiento de la homeostasis tisular⁵⁸. Clásicamente los macrófagos M1 activados expresan ITGAX (CD11c), mientras que los

macrófagos M2 activados alternativamente expresan altos niveles de CD206, aunque el receptor CD163 también puede ser un marcador de los macrófagos M2 en humanos²⁹⁸. Los macrófagos de los sujetos con normopeso clásicamente han sido clasificados como macrófagos activados alternativamente M2²⁹⁹. En este estudio, ITGAX no alcanzó una diferencia estadística entre los grupos, pero se encontró una mayor cantidad de CD206 y CD163 en el TASC de los pacientes con NPME, lo que posiblemente indica un fenotipo M2 de éstos individuos³⁰⁰. Sin embargo, se sabe que los MTA presentan estados mixtos que podrían no tener fenotipos estrictamente diferenciados en M1/M2³⁰¹, existiendo un cierto grado de plasticidad fenotípica de los MTA que debería de estudiarse mejor en posteriores estudios.

Los niveles circulantes de citoquinas en individuos NPME son comparables a los medidos en los individuos ObME²⁴⁴. Esto pone de manifiesto la idea de que la inflamación, aparte del peso corporal, es un colaborador independiente para el riesgo cardiometabólico. Los macrófagos activados alternativamente M2 están estimulados por la IL-10 antiinflamatoria (entre otros). La IL-10 es esencial para algunos tipos de polarizaciones M2 en individuos con normopeso a través del estímulo MerTK¹⁷⁵. Sin embargo, en nuestro estudio, no se observó mayor cantidad de esta citoquina en los sujetos NPME, aunque sí un aumento en los niveles de MerTK.

Se ha demostrado que los individuos NPME tienen mayores niveles plasmáticos de leptina, TNF α e IL-6, y los niveles de adiponectina más bajos en comparación con los individuos NPMS²⁴³. Los MTAs son responsables de casi toda la expresión de TNF α del tejido adiposo y de cantidades importantes de expresión de IL-6⁸⁷. En nuestro estudio, se estudiaron las principales citoquinas proinflamatorias, TNF α e IL-6, así como IL-1b, CCL2 y CCL3. Sin embargo, no se observó una diferencia clara entre ambos para estos

marcadores inflamatorios M1. A pesar de las diferencias encontradas en la infiltración de macrófagos, la inflamación del tejido adiposo no difirió en el momento de la medición. Aunque no se encontraron asociaciones directas entre la infiltración de macrófagos y la inflamación, podrían estar relacionados con la PCR en suero, que se sabe que está relacionada con la liberación de quimioquinas CC³⁰². Probablemente esto podría estar relacionado con el hecho de que en los MTAs humanos en sujetos con normopeso se expresa un fenotipo mixto M1/M2³⁰³.

Se han encontrado muchas asociaciones entre los marcadores de macrófago/monocitos y los parámetros del síndrome metabólico. El c-HDL se correlaciona negativamente con las variables de macrófagos / monocitos como CD68, ITGAM y CD33 en el TASC, lo que demuestra que la primera etapa de la infiltración en el tejido adiposo de los sujetos de peso normal se asocia con un menor c-HDL, como también se ha visto en los sujetos obesos^{304,305}. Esto podría explicarse por un cambio en los procesos de transporte inverso del colesterol debido a la inflamación del tejido adiposo, que hace que circulen niveles más bajos de c-HDL. De hecho, un aspecto interesante de la biología de los macrófagos es su papel importante en el metabolismo de los lípidos y del hierro. El c-HDL es detectado por los macrófagos e induce la reprogramación de estas células, reprimiendo de ese modo un programa inflamatorio, mientras que, al mismo tiempo, aumenta la capacidad de las células para metabolizar el colesterol³⁰⁶.

Otro parámetro que parece estar afectado por la infiltración de los macrófagos es la presión arterial sistólica, que se asocia sobre todo con CD163 y CD68, tanto en el TASC como en el TAV. Esto podría explicarse por la disfunción endotelial y el aumento de la resistencia vascular relacionada con citoquinas inflamatorias secretadas por monocitos / macrofagos³⁰⁷. Por tanto, una relación entre CD163 y TNF α , similar a la encontrada en este

estudio, podría ser la explicación de la relación entre CD163 y la presión arterial; el TNF α disminuye la producción de óxido nítrico (NO) y mejora la eliminación de NO en las células endoteliales que conduce a la alteración de la vasodilatación mediada por NO³⁰⁷. Por otro lado, los TG se han relacionado principalmente con el TASC, y en especial con la expresión de CD33, ITGAM, MerTK, y CCL3, aunque se ha encontrado una asociación directa también con CD206 en el TAV. Esta relación con la infiltración de macrófagos en el TASC podría estar relacionada con el hecho de que la hipertrigliceridemia es un activador de leucocitos, y por esa razón se considera como una alternativa proinflamatoria y un mecanismo proaterogénico asociado con la generación de estrés oxidativo³⁰⁸, algo relacionado con el hecho de que la activación de los macrófagos M2 depende de la oxidación de ácidos grasos³⁰⁹. Sin embargo, aunque la inflamación del tejido adiposo puede afectar al c-HDL, la causalidad puede estar en la otra dirección, y a que un nivel más alto de c-HDL limite el reclutamiento de MTAs³⁰⁵.

Otro aspecto importante que se trata en este estudio se relaciona con las capacidades lipogénicas y adipogénicas del tejido adiposo. Un análisis completo del transcriptoma del TASC de sujetos ObMS demostró que los genes implicados en el ciclo metabólico del ácido tricarboxílico y de aminoácidos de cadena ramificada estuvieron menos afectados en comparación con los individuos ObME, lo que sugiere una función del TASC más favorable en los individuos ObMS³¹⁰. De esta manera, en este estudio hemos observado que PPAR γ estaba alterado, observándose una regulación a la baja en el TASC, que podría explicarse porque el ambiente inflamatorio inhibe la actividad del PPAR γ a nivel de expresión génica, dando lugar a una pérdida de función³¹¹. Esta pérdida de función de la adipogénesis puede atribuirse a la infiltración de macrófagos / monocitos por la relación negativa entre los marcadores adipogénicos y los macrófagos / monocitos.

El PPAR γ es el gen central en la adipogénesis. PPAR γ modula la maduración³¹² e infiltración³¹³ de los macrófagos en el tejido adiposo; por otra parte, se expresa en monocitos / macrófagos, y sus ligandos inhiben la producción de mediadores inflamatorios por estas células^{313,311}. Estas observaciones han planteado la posibilidad de que PPAR γ pueda desempeñar un papel fisiológico en la modulación de la magnitud y la duración de las respuestas inflamatorias en las que los macrófagos juegan papeles importantes³¹⁴. A su vez, también juega un papel anti-inflamatorio inhibiendo la expresión de moléculas proinflamatorias y la migración de macrófagos³¹⁵. Por tanto, PPAR γ controla el potencial inflamatorio de los macrófagos y determina el fenotipo de macrófagos en el tejido adiposo³¹⁶, probablemente al fenotipo M2 descrito, ya que la polarización de los macrófagos M1 a M2 es dependiente de PPAR γ ³¹⁶.

Una mayor inflamación está acompañada normalmente de una menor capacidad lipogénica. Se detectó una menor expresión de PPAR γ en los sujetos NPME, mientras que el FABP4 no se vio afectado. Sin embargo, PPAR γ y FABP4 presentaron una correlación positiva entre ellos tanto en el TASC como en el TAV.

En cuanto a los estudios de diferenciación adipogénica realizados en este trabajo, la primera apreciación es que las capacidades de diferenciación del TASC y del TAV difieren, con una menor capacidad del TAV³¹⁷. Además, las células mesenquimales diferenciadas mostraron una regulación negativa de ADRP y FABP4 en el TASC en sujetos NPME que, aunque no alcanzaron significación estadística, mostraron la tendencia que seguirían los adipocitos si no se corrigieran los trastornos metabólicos.

ADRP juega un papel importante en la regulación del almacenamiento de lípidos. Por tanto, la expresión de mRNA de ADRP aumenta a medida que avanza la diferenciación adipocitaria¹⁵⁷, un fenómeno asociado con la

expansión de las reservas de gotículas lipídicas y el aumento de los TG celulares¹⁵⁷, acción en la que también se requiere FABP4. Por otra parte, ADRP tiene una regulación dependiente de PPAR γ ¹⁹⁷, por lo que una disminución en PPAR γ causaría una disminución en ADRP. Los macrófagos activados por estímulos inflamatorios mejoran la expresión de ADRP³¹⁸, aunque se han descrito varias citoquinas que inhiben la diferenciación de los adipocitos³¹⁹, fenómeno que podría estar empezando a darse en nuestros pacientes. Por tanto, la alteración de la adipogénesis podría contribuir a la disfunción del TASC encontrada en sujetos ME.

Finalmente, PPAR γ está fuertemente asociado al c-HDL. Recientemente se han formulado muchas teorías sobre la importancia de mantener niveles elevados de c-HDL. De esta manera, los agonistas de PPAR γ no sólo tiene efectos beneficiosos sobre la homeostasis de la glucosa, aumentando la sensibilidad a la insulina y reduciendo los niveles de glucosa en sangre, sino que también beneficia el metabolismo de los lípidos elevando el c-HDL plasmático³²⁰. Además, este aumento en la cantidad de c-HDL se acompaña de un aumento en la calidad del c-HDL, haciéndolo un mejor aceptor del colesterol celular³²¹.

En esta línea, PPAR γ tiene un papel regulador en los primeros pasos de la vía inversa de transporte de colesterol a través de la activación del ATP-Binding Cassette Transporter , subfamilia a, miembro 1 (ABCA1), mediada por el flujo de colesterol en macrófagos humanos³²². Así, los niveles de cHDL parecen ser el mayor factor determinante en los sujetos con peso normal en relación a su status de síndrome metabólico, actuando en la función adipogénica a través de PPAR γ .

Por otro lado, las quimioquinas CC, tales como CCL2 y CCL3, son esenciales para la atracción de las células mononucleares de la circulación a los tejidos. Además, la función de los receptores de quimioquinas en el tejido

adiposo está íntimamente ligado a la sensibilidad a la insulina. Por lo tanto, las quimioquinas CC expresadas en el tejido adiposo podrían desempeñar un papel en la promoción de la inflamación del tejido adiposo en relación con una disfunción metabólica en este tejido.

Si bien el papel de los MTAs en la patogénesis del tejido adiposo ha quedado claramente patente con los resultados de este trabajo, hay otras características asociadas al fenotipo NPME que han resultado del estudio de esta población y merecen ser reseñadas. En particular, la diferencia encontrada en los parámetros relativos al metabolismo del hierro: sideremia y transferrina y ferritina plasmáticas. Clásicamente, la ferritina era conocida como una proteína intracelular que regulaba la homeostasis del hierro³²³. La creciente evidencia indica que niveles elevados de hierro sérico pueden tener un impacto deletéreo en la salud³²⁴. Los parámetros anormales del estado de hierro que indican su déficit o sobrecarga son hallazgos frecuentes en sujetos con sobrepeso y obesidad. El deterioro de su estado funcional se relaciona principalmente con la inflamación del tejido adiposo y el aumento de la expresión de hepcidina, proteína reguladora del hierro sistémico. Las citoquinas tales como TNF α , IL-1 e IL-6 junto con adipoquinas (leptina, resistina) o hepcidina pueden representar señales de obesidad e inflamación del tejido adiposo que facilitan cambios en la homeostasis del hierro³²⁵. Algunos metanálisis han encontrado una relación positiva entre niveles elevados de ferritina e hipertensión, DM2, obesidad abdominal e hiperlipemia^{326,327,328}. Así como hay estudios que muestran esta relación con una mayor IR³²⁹ o con el síndrome del ovario poliquístico en mujeres con sobrepeso u obesidad³³⁰. En nuestro trabajo, encontramos cómo la ferritina se correlaciona positivamente aunque sin significación estadística, con los niveles de glucosa y TG. Pero lo que fue más llamativo fue su asociación estadísticamente significativa con el ácido úrico, la cual persistió tras el análisis de regresión múltiple por pasos, siendo la ferritina y la cintura las que explican

los niveles de ácido úrico. Esto nos puede dar pie a considerarlos como marcadores séricos de síndrome metabólico a tener en cuenta, y por tanto más sencillos de medir, en sujetos con normopeso. Casi todos los estudios publicados hasta ahora no consideran el hecho del normopeso, aunque algunos sí establecen esta distinción en sus resultados y destacan la asociación entre concentraciones elevadas de ferritina sérica circulante con mayor riesgo de síndrome metabólico independientemente de la obesidad, el estado inflamatorio y los niveles de determinadas adipocinas³³¹, incluso alguno se aventuran a afirmar el papel crucial de la ferritina en la patogénesis del síndrome metabólico en sujetos previamente sanos³³².

Aunque la mayor fortaleza de este trabajo es su novedad en el enfoque del estudio de la infiltración de macrófagos / monocitos en sujetos NPME, hay varias limitaciones en este estudio. En primer lugar, debido a las limitaciones inherentes a un diseño de un estudio transversal, no fue posible aclarar una relación causal entre el contenido de MTA y los trastornos metabólicos. En segundo lugar, nuestros resultados fueron generados a partir de datos de expresión génica, y por lo tanto necesitan la replicación utilizando otros métodos, tales como la citometría de flujo. Sin embargo, estudios anteriores mostraron que la expresión de marcadores de macrófagos se correlaciona bien con la infiltración real en el tejido adiposo^{130,305}.

Se puede cuestionar si los individuos NPME se convertirán en individuos ObME con el tiempo. Los datos de este trabajo refuerzan la idea de que la infiltración de macrófagos en el TASC de sujetos NPME puede contribuir a causar alteraciones metabólicas que conducen a la DM2 o las enfermedades cardiovasculares. Por tanto, es posible que la estimación del contenido de macrófagos en TASC pueda ser utilizado para predecir el riesgo de enfermedad metabólica en estos pacientes⁴. Por otra parte, la adipogénesis en el TASC parece ser una de las complicaciones relacionadas con el síndrome

metabólico, que muestra una reducción en sujetos NPME. Mientras que el parámetro del síndrome metabólico que más se ha relacionado con la infiltración de macrófagos / monocitos ha sido el c-HDL.

Por lo tanto, el aumento de la infiltración subcutánea por MTA puede explicar por qué algunas personas de peso normal y las personas obesas desarrollan una enfermedad metabólica, mientras que otros permanecen MS. Otros descubrimientos moleculares facilitarán estrategias de gestión de la salud orientadas a la función del tejido adiposo.

CONCLUSIONES

1. La funcionalidad del TASC falla antes que la del TAV, incluso antes de que el peso corporal se vea aumentado, indicando que el IMC no es el parámetro más importante para la función metabólica.
2. La infiltración de macrófagos en el TASC se asocia a los trastornos metabólicos que podrían conducir a la diabetes o enfermedades cardiovasculares en los sujetos con normopeso. Es posible que la estimación del contenido de macrófagos en el TASC pueda utilizarse para predecir el riesgo de enfermedad metabólica en los pacientes.
3. La alteración de la adipogénesis en el tejido adiposo subcutáneo es una de las complicaciones relacionadas con el síndrome metabólico, mostrando una reducción en sujetos con normopeso metabólicamente no saludables.
4. El parámetro de síndrome metabólico más relacionado con la infiltración de macrófagos / monocitos en los sujetos con normopeso fue el c-HDL.
5. El aumento de la infiltración de MTAs en el TASC podría explicar por qué algunos individuos de peso normal desarrollan enfermedad metabólica mientras que otros siguen siendo metabólicamente sanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO | Obesity and overweight. at
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>
2. Tejera Pérez, C. & Enríquez Acosta, L. in *Sobrepeso y obesidad* (ed. Bellido Guerrero, D.) 29–43 (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad, 2015).
3. Salas-Salvadó, J., Rubio, M. A., Barbany, M., Moreno, B. & de la SEEDO*, G. C. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med. Clin. (Barc)*. **128**, 184–196 (2007).
4. De Lorenzo, A. *et al.* Adiposity rather than BMI determines metabolic risk. *Int. J. Cardiol.* **166**, 111–117 (2013).
5. Bray G, Bouchard C, J. W. Definitions and proposed current classifications of obesity. *Handb. obesity. New York Marcel Dekker* 31–40 (1998).
6. Tataranni, P. A. & Ortega, E. A Burning Question: Does an Adipokine-Induced Activation of the Immune System Mediate the Effect of Overnutrition on Type 2 Diabetes? *Diabetes* **54**, 917–927 (2005).
7. Marti, A., Moreno-Aliaga, M. J., Hebebrand, J. & Martínez, J. A. Genes, lifestyles and obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **28 Suppl 3**, S29-36 (2004).
8. Palou, A., Serra, F., Bonet, M. L. & Picó, C. Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur. J. Nutr.* **39**, 127–144 (2000).
9. Woods, S. C., Seeley, R. J., Porte, D. & Schwartz, M. W. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* **280**, 1378–1383 (1998).
10. Rankinen, T. *et al.* The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*. **14**, 529–644 (2006).
11. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J. & Baskin, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature, Publ. online 06 April 2000; | doi10.1038/10.1038/35007534* **404**, 661 (2000).
12. Zurbano Inchusta, R., Ochoa Nieto, M., Moreno-Aliaga, M. & Marti del Moral, A. Estudios sobre obesidad de origen monogénico en humanos. *Rev Esp Obes* **2**, 269–278 (2004).
13. Clapham, J. C. *et al.* Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* **406**, 415–418 (2000).

14. Meier, U. & Gressner, A. M. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin. Chem.* **50**, 1511–1525 (2004).
15. Rosmond R. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology* **30**, 1–10 (2005).
16. Adán, C. *et al.* Oleoyl-estrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and obese Zucker rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **23**, 366–373 (1999).
17. Hammond, L. E. *et al.* Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-deficient mice have reduced weight and liver triacylglycerol content and altered glycerolipid fatty acid composition. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8204–8214 (2002).
18. Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.-H. & Sul, H. S. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 47066–47075 (2004).
19. Rössner, S. Can obesity be an infectious disease? *Läkartidningen* **102**, 1896–1898
20. Gallou-Kabani, C. & Junien, C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes* **54**, 1899–1906 (2005).
21. Moreno-Indias, I. *et al.* Neonatal Androgen Exposure Causes Persistent Gut Microbiota Dysbiosis Related to Metabolic Disease in Adult Female Rats. *Endocrinology* **157**, 4888–4898 (2016).
22. Rankinen, T. & Bouchard, C. Genetics of food intake and eating behavior phenotypes in humans. *Annu. Rev. Nutr.* **26**, 413–434 (2006).
23. Tai, E. S., Lau, T. N., Ho, S. C., Fok, a C. & Tan, C. E. Body fat distribution and cardiovascular risk in normal weight women. Associations with insulin resistance, lipids and plasma leptin. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24**, 751–757 (2000).
24. Janssen, I., Katzmarzyk, P. T. & Ross, R. Body mass index, waist circumference, and health risk: evidence in support of current National Institutes of Health guidelines. *Arch. Intern. Med.* **162**, 2074–2079 (2002).
25. Stolk, R. P., Meijer, R., Mali, W. P. T. M., Grobbee, D. E. & van der Graaf, Y. Ultrasound measurements of intraabdominal fat estimate the metabolic syndrome better than do measurements of waist circumference. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 857–860 (2003).
26. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Report of a WHO Consultation.



27. Expert Panel on Detection, Evaluation, and T. of H. B. C. in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486–2497 (2001).
28. Alberti, K., Zimmet, P. & Shaw, J. The metabolic syndrome - a new worldwide definition. *Lancet* **366**, 1059–1062 (2005).
29. Ford, E. S., Giles, W. H. & Dietz, W. H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* **287**, 356–359 (2002).
30. Martínez-Larrad, M. T. *et al.* Prevalencia del síndrome metabólico (criterios del ATP-III). Estudio de base poblacional en áreas rural y urbana de la provincia de Segovia. *Med. Clin. (Barc)*. **125**, 481–486 (2005).
31. Álvarez León, E. E., Ribas Barba, L. & Serra Majem, L. Prevalencia del síndrome metabólico en la población de la Comunidad Canaria. *Med. Clin. (Barc)*. **120**, 172–174 (2003).
32. Ascaso, J. *et al.* Abdominal obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome in a southern European population. *Eur. J. Intern. Med.* **14**, 101–106 (2003).
33. Grupo Dorica., Aranceta, J. & Millán, J. *Obesidad y riesgo cardiovascular: estudio Dorica*. (Editorial Médica Panamericana, 2004).
34. Troiano, R. P., Frongillo, E. A., Sobal, J. & Levitsky, D. A. The relationship between body weight and mortality: a quantitative analysis of combined information from existing studies. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **20**, 63–75 (1996).
35. Manson, J. E., Stampfer, M. J., Hennekens, C. H. & Willett, W. C. Body weight and longevity. A reassessment. *JAMA* **257**, 353–358 (1987).
36. Lemoine, A. Y., Ledoux, S. & Larger, E. Adipose tissue angiogenesis in obesity. *Thromb. Haemost.* **110**, 661–668 (2013).
37. Romacho, T., Elsen, M., Röhrborn, D. & Eckel, J. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol.* **210**, 733–753 (2014).
38. Cao, R., Brakenhielm, E., Wahlestedt, C., Thyberg, J. & Cao, Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6390–6395 (2001).
39. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 85–97 (2011).
40. Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional

- differences. *Obes. Rev.* **11**, 11–18 (2010).
41. Miranda, M. *et al.* Paired Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue Aquaporin-7 Expression in Human Obesity and Type 2 Diabetes: Differences and Similarities between Depots. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 3470–3479 (2010).
 42. Fox, C. S. *et al.* Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* **116**, 39–48 (2007).
 43. Wajchenberg, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* **21**, 697–738 (2000).
 44. Freedland, E. S. Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr. Metab. (Lond)*. **1**, 12 (2004).
 45. Bjorntorp, P. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obes. Rev.* **2**, 73–86 (2001).
 46. Mårin, P. *et al.* The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism* **41**, 1242–1248 (1992).
 47. Misra, A. *et al.* Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition* **19**, 457–466 (2003).
 48. Brundu S, F. a. Polarization and Repolarization of Macrophages. *J. Clin. Cell. Immunol.* **6**, 1–10 (2015).
 49. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**, 445–455 (2013).
 50. Taylor, P. R. *et al.* Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 901–944 (2005).
 51. Bornstein, S. R. *et al.* Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* **49**, 532–538 (2000).
 52. Xu, H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–1830 (2003).
 53. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–964 (2005).
 54. Surmi, B. K. & Hasty, A. H. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol.* **3**, 545–556 (2008).
 55. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35

- (2003).
56. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
 57. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133–146 (2003).
 58. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* **13**, 453–461 (2008).
 59. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
 60. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, 13 (2014).
 61. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
 62. Hart, P. H., Burgess, D. R., Vitti, G. F. & Hamilton, J. A. Interleukin-4 stimulates human monocytes to produce tissue-type plasminogen activator. *Blood* **74**, 1222–1225 (1989).
 63. Chizzolini, C., Rezzonico, R., De Luca, C., Burger, D. & Dayer, J. M. Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. *J. Immunol.* **164**, 5952–5960 (2000).
 64. Gratchev, A. *et al.* Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand. J. Immunol.* **53**, 386–392 (2001).
 65. Törőcsik, D., Bárdos, H., Nagy, L. & Ádány, R. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2132–2139 (2005).
 66. Anderson, C. F. & Mosser, D. M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 101–106 (2002).
 67. Wang, Q. *et al.* Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell Res.* **20**, 701–712 (2010).
 68. Ye, J. Adipose Tissue Vascularization: Its Role in Chronic Inflammation. *Curr. Diab. Rep.* **11**, 203–210 (2011).
 69. Bartness, T. J., Liu, Y., Shrestha, Y. B. & Ryu, V. Neural innervation of white

- adipose tissue and the control of lipolysis. *Front. Neuroendocrinol.* **35**, 473–493 (2014).
70. Hellmer, J., Marcus, C., Sonnenfeld, T. & Arner, P. Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **75**, 15–20 (1992).
 71. Arner, P., Hellström, L., Wahrenberg, H. & Brönnegård, M. Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. *J. Clin. Invest.* **86**, 1595–1600 (1990).
 72. Krief, S. *et al.* Tissue Distribution of β 3-adrenergic Receptor mRNA in Man. **91**, 344–349 (1993).
 73. Joyner, J. M., Hutley, L. J. & Cameron, D. P. Glucocorticoid receptors in human preadipocytes: regional and gender differences. *J. Endocrinol.* **166**, 145–152 (2000).
 74. Rebuffé-Scrive, M., Lundholm, K. & Björntorp, P. Glucocorticoid hormone binding to human adipose tissue. *Eur. J. Clin. Invest.* **15**, 267–271 (1985).
 75. Björntorp, P. Endocrine abnormalities of obesity. *Metabolism.* **44**, 21–23 (1995).
 76. Pedersen, S. B. *et al.* Identification of oestrogen receptors and oestrogen receptor mRNA in human adipose tissue. *Eur. J. Clin. Invest.* **26**, 262–269 (1996).
 77. Trayhurn, P. & Wood, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* **92**, 347–355 (2004).
 78. Matsuzawa, Y. Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **3**, 35–42 (2006).
 79. Tritos, N. A. & Mantzoros, C. S. Leptin: its role in obesity and beyond. *Diabetologia* **40**, 1371–1379 (1997).
 80. Ahima, R. S. Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. *J. Clin. Invest.* **118**, 2380–2383 (2008).
 81. Kawano, J. & Arora, R. The Role of Adiponectin in Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Disease. *J. Cardiometab. Syndr.* **4**, 44–49 (2009).
 82. Mantzoros, C. S. *et al.* Leptin Concentrations in Relation to Body Mass Index and the Tumor Necrosis Factor- α System in Humans ¹. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 3408–3413 (1997).
 83. Kirchgessner, T. G., Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. & Hotamisligil, G. S. Tumor necrosis factor- α contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J. Clin. Invest.* **100**, 2777–2782 (1997).
 84. Ouchi, N. *et al.* Novel Modulator for Endothelial Adhesion Molecules : Adipocyte-Derived Plasma Protein Adiponectin. *Circulation* **100**, 2473–2476 (1999).

85. Richelsen, B., Bruun, J., Verdic, C., Astrup, A. & Lihn, A. Regulation of adiponectin by cytokines in humans. In vivo and in vitro investigations. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E527-533 (2003).
86. Motoshima, H. *et al.* Differential Regulation of Adiponectin Secretion from Cultured Human Omental and Subcutaneous Adipocytes: Effects of Insulin and Rosiglitazone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 5662–5667 (2002).
87. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–808 (2003).
88. Lemieux, I. *et al.* Elevated C-Reactive Protein: Another Component of the Atherothrombotic Profile of Abdominal Obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 961–967 (2001).
89. Pepys, M. B. & Hirschfield, G. M. C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest.* **112**, 299–299 (2003).
90. Forouhi, N. G., Sattar, N. & McKeigue, P. M. Relation of C-reactive protein to body fat distribution and features of the metabolic syndrome in Europeans and South Asians. *Int. J. Obes.* **25**, 1327–1331 (2001).
91. Pou, K. M. *et al.* Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Volumes Are Cross-Sectionally Related to Markers of Inflammation and Oxidative Stress: The Framingham Heart Study. *Circulation* **116**, 1234–1241 (2007).
92. Karlsson, C. *et al.* Human adipose tissue expresses angiotensinogen and the enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3925–3929 (1998).
93. Dusserre, E., Moulin, P. & Vidal, H. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1500**, 88–96 (2000).
94. Alessi, M. C. *et al.* Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* **46**, 860–867 (1997).
95. Abate, N., Garg, A., Peshock, R. M., Stray-Gundersen, J. & Grundy, S. M. Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J. Clin. Invest.* **96**, 88–98 (1995).
96. Frayn, K. N. Visceral fat and insulin resistance — causative or correlative? *Br. J. Nutr.* **83**, S71–S77 (2000).
97. Björntorp, P. Metabolic difference between visceral fat and subcutaneous abdominal

- fat. *Diabetes Metab.* **26 Suppl 3**, 10–12 (2000).
98. Salans, L. B., Cushman, S. W. & Weismann, R. E. Studies of Human Adipose Tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *J. Clin. Invest.* **52**, 929–941 (1973).
99. Kadowaki, T. *et al.* Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **228**, 1111–1117 (2003).
100. Arner, P. Differences in Lipolysis between Human Subcutaneous and Omental Adipose Tissues. *Ann. Med.* **27**, 435–438 (1995).
101. Lemieux, S. & Després, J. P. Metabolic complications of visceral obesity: contribution to the aetiology of type 2 diabetes and implications for prevention and treatment. *Diabète & métabolisme* **20**, 375–393 (1994).
102. Arner, P. Obesity and the adipocyte. *J. Endocrinol.* **155**, 191–192 (1997).
103. Dobbela, C. J., Joffres, M. R., MacLean, D. R. & Flowerdew, G. A comparative evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio and body mass index as indicators of cardiovascular risk factors. The Canadian Heart Health Surveys. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **25**, 652–661 (2001).
104. Després, J. P., Allard, C., Tremblay, A., Talbot, J. & Bouchard, C. Evidence for a regional component of body fatness in the association with serum lipids in men and women. *Metabolism*. **34**, 967–973 (1985).
105. Alberti, K. G. M. M. *et al.* Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation* **120**, 1640–1645 (2009).
106. Bergstrom, R. W. *et al.* Association of elevated fasting C-peptide level and increased intra-abdominal fat distribution with development of NIDDM in Japanese-American men. *Diabetes* **39**, 104–111 (1990).
107. Rocchini, A. Obesity hypertension. *Am. J. Hypertens.* **15**, S50–S52 (2002).
108. Sharma, A. M., Engeli, S. & Pischon, T. New developments in mechanisms of obesity-induced hypertension: Role of adipose tissue. *Curr. Hypertens. Rep.* **3**, 152–156 (2001).
109. McFarlane, S. I., Banerji, M. & Sowers, J. R. Insulin Resistance and Cardiovascular Disease¹. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 713–718 (2001).
110. Després, J.-P. The athero-thrombotic and inflammatory profile of visceral obesity. *Int. Congr. Ser.* **1253**, 27–34 (2003).
111. Tankó, L. B. *et al.* Enlarged Waist Combined With Elevated Triglycerides Is a Strong Predictor of Accelerated Atherogenesis and Related Cardiovascular Mortality in

- Postmenopausal Women. *Circulation* **111**, 1883–1890 (2005).
112. Lemieux, I. *et al.* Hypertriglyceridemic Waist: A Marker of the Atherogenic Metabolic Triad (Hyperinsulinemia; Hyperapolipoprotein B; Small, Dense LDL) in Men? *Circulation* **102**, 179–184 (2000).
 113. Harris, M. M., Stevens, J., Thomas, N., Schreiner, P. & Folsom, A. R. Associations of Fat Distribution and Obesity with Hypertension in a Bi-ethnic Population: The ARIC Study. *Obes. Res.* **8**, 516–524 (2000).
 114. Planas, A. *et al.* Relationship of obesity distribution and peripheral arterial occlusive disease in elderly men. *Int. J. Obes.* **25**, 1068–1070 (2001).
 115. Mulyadi, L., Stevens, C., Munro, S., Lingard, J. & Bermingham, M. Body Fat Distribution and Total Body Fat as Risk Factors for Microalbuminuria in the Obese. *Ann. Nutr. Metab.* **45**, 67–71 (2001).
 116. Fontbonne, A. *et al.* Hyperinsulinaemia as a predictor of coronary heart disease mortality in a healthy population: the Paris Prospective Study, 15-year follow-up. *Diabetologia* **34**, 356–361 (1991).
 117. Kissebah, A. H. Central obesity: Measurement and metabolic effects. **5**, 8–20 (1997).
 118. Lemieux, S. *et al.* Are gender differences in cardiovascular disease risk factors explained by the level of visceral adipose tissue? *Diabetologia* **37**, 757–764 (1994).
 119. Tankó, L., Bagger, Y. Z., Alexandersen, P., Larsen, P. J. & Christiansen, C. Central and peripheral fat mass have contrasting effect on the progression of aortic calcification in postmenopausal women. *Eur. Heart J.* **24**, 1531–1537 (2003).
 120. Tankó, L. B., Bagger, Y. Z., Alexandersen, P., Larsen, P. J. & Christiansen, C. Peripheral Adiposity Exhibits an Independent Dominant Antiatherogenic Effect in Elderly Women. *Circulation* **107**, 1626–1631 (2003).
 121. Dagenais, G. R. *et al.* Prognostic impact of body weight and abdominal obesity in women and men with cardiovascular disease. *Am. Heart J.* **149**, 54–60 (2005).
 122. Lee, I.-M. *et al.* Epidemiologic Data on the Relationships of Caloric Intake, Energy Balance, and Weight Gain Over the Life Span With Longevity and Morbidity. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **56**, 7–19 (2001).
 123. Zhang, X. *et al.* Abdominal Adiposity and Mortality in Chinese Women. *Arch. Intern. Med.* **167**, 886 (2007).
 124. Kuk, J. L. *et al.* Visceral Fat Is an Independent Predictor of All-cause Mortality in Men. *Obesity* **14**, 336–341 (2006).
 125. Armellini, F. *et al.* Sonography detection of small intra-abdominal fat variations. *Int.*

- J. Obes.* **15**, 847–852 (1991).
126. Selvin, E., Paynter, N. P. & Erlinger, T. P. The effect of weight loss on C-reactive protein: a systematic review. *Arch. Intern. Med.* **167**, 31–39 (2007).
 127. Corpeleijn, E. *et al.* Lifestyle intervention and adipokine levels in subjects at high risk for type 2 diabetes: the Study on Lifestyle intervention and Impaired glucose tolerance Maastricht (SLIM). *Diabetes Care* **30**, 3125–3127 (2007).
 128. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–867 (2006).
 129. Siriwardhana, N. *et al.* Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 613–623 (2013).
 130. Ortega Martínez de Victoria, E. *et al.* Macrophage content in subcutaneous adipose tissue: associations with adiposity, age, inflammatory markers, and whole-body insulin action in healthy Pima Indians. *Diabetes* **58**, 385–393 (2009).
 131. Domínguez García, M., Gabriel, G., Bravo, H. & Mendoza López, A. A. La reacción inflamatoria en la fisiopatogenia de la obesidad. *Cienc. ergo sum* **19**, 75–82 (2012).
 132. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 85–97 (2011).
 133. Bastarrachea, R. A. *et al.* Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gac. Med. Mex.* **143**, 505–512 (2007).
 134. Weisberg, S. P. *et al.* CCR2 modulates inflammatory and metabo. *J. Clin. Invest.* **116**, 115–124 (2006).
 135. Menten, P., Wuyts, A. & Van Damme, J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 455–481 (2002).
 136. Lilja, H. E. *et al.* An adipoinductive role of inflammation in adipose tissue engineering: key factors in the early development of engineered soft tissues. *Stem Cells Dev.* **22**, 1602–1613 (2013).
 137. Serhan, C. N. & Petasis, N. A. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem. Rev.* **111**, 5922–5943 (2011).
 138. Zeyda, M. & Stulnig, T. M. Adipose tissue macrophages. *Immunol. Lett.* **112**, 61–67 (2007).
 139. Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C. & Hauner, H. Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 1023–1033 (2007).
 140. Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783–787

- (2008).
141. de Ferranti, S. & Mozaffarian, D. The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences. *Clin. Chem.* **54**, 945–955 (2008).
 142. Hoffstedt, J. *et al.* Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia* **53**, 2496–2503 (2010).
 143. Veilleux, A., Caron-Jobin, M., Noël, S., Laberge, P. Y. & Tchernof, A. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes* **60**, 1504–1511 (2011).
 144. Tinahones, F. J. *et al.* Obesity and insulin resistance-related changes in the expression of lipogenic and lipolytic genes in morbidly obese subjects. *Obes. Surg.* **20**, 1559–1567 (2010).
 145. Tan, C. Y. & Vidal-Puig, A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 935–940 (2008).
 146. Virtue, S. & Vidal-Puig, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome — An allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 338–349 (2010).
 147. Sethi, J. K. & Vidal-Puig, A. J. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid Res.* **48**, 1253–1262 (2007).
 148. Bennett, C. N. *et al.* Regulation of Wnt Signaling during Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 30998–31004 (2002).
 149. Laudes, M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *J. Mol. Endocrinol.* **46**, R65–72 (2011).
 150. Jones, S. E. & Jomary, C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* **24**, 811–820 (2002).
 151. Ehrlund, A. *et al.* Characterization of the Wnt Inhibitors Secreted Frizzled-Related Proteins (SFRPs) in Human Adipose Tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E503–E508 (2013).
 152. Ouchi, N. *et al.* Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* **329**, 454–457 (2010).
 153. Lagathu, C. *et al.* Secreted frizzled-related protein 1 regulates adipose tissue expansion and is dysregulated in severe obesity. *Int. J. Obes. (Lond)*. **34**, 1695–1705 (2010).

154. Moreno-Indias, I., Tinahones, F. J., Moreno-Indias, I. & Tinahones, F. J. Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *J. Diabetes Res.* **2015**, 970375 (2015).
155. Muller, C. The CCAAT Enhancer-binding Protein (C/EBP) Requires a SWI/SNF Complex for Proliferation Arrest. *J. Biol. Chem.* **279**, 7353–7358 (2003).
156. Rosen, E. D. *et al.* C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* **16**, 22–26 (2002).
157. Bickel, M., Tansey, P. & Welte, J. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 419–440 (2009).
158. Wang, H. & Eckel, R. H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **297**, 271–288 (2009).
159. Baglioni, S. *et al.* Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J.* **23**, 3494–3505 (2009).
160. Oliva-Olivera, W. *et al.* Adipogenic impairment of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in subjects with metabolic syndrome: possible protective role of FGF2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* jc.2016-2256 (2016). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27967316>>
161. Isakson, P., Hammarstedt, A., Gustafson, B. & Smith, U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation. *Diabetes* **58**, 1550–1557 (2009).
162. Cleveland-Donovan, K. *et al.* IGF-I activation of the AKT pathway is impaired in visceral but not subcutaneous preadipocytes from obese subjects. *Endocrinology* **151**, 3752–3763 (2010).
163. Roldan, M., Macias-Gonzalez, M., Garcia, R., Tinahones, F. J. & Martin, M. Obesity short-circuits stemness gene network in human adipose multipotent stem cells. *FASEB J.* **25**, 4111–4126 (2011).
164. Sorisky, A. & Gagnon, A. Clinical Implications of Adipose Tissue Remodelling: Adipogenesis and Apoptosis. **26**, 232–240 (2002).
165. Cinti, S. *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* **46**, 2347–2355 (2005).
166. Keuper, M. *et al.* An inflammatory micro-environment promotes human adipocyte apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* **339**, 105–113 (2011).
167. Arner, P. & Spalding, K. L. *Fat cell turnover in humans. Biochemical and Biophysical*

- Research Communications* **396**, (2010).
168. Tinahones, F. J. *et al.* Caspase induction and BCL2 inhibition in human adipose tissue: a potential relationship with insulin signaling alteration. *Diabetes Care* **36**, 513–521 (2013).
 169. Chacón, M. R. *et al.* Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine* **33**, 129–137 (2006).
 170. Vendrell, J. *et al.* Tumor Necrosis-Like Weak Inducer of Apoptosis as a Proinflammatory Cytokine in Human Adipocyte Cells: Up-Regulation in Severe Obesity Is Mediated by Inflammation But Not Hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 2983–2992 (2010).
 171. Maymó-Masip, E. *et al.* The Rise of Soluble TWEAK Levels in Severely Obese Subjects After Bariatric Surgery May Affect Adipocyte-Cytokine Production Induced by TNF α . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E1323–E1333 (2013).
 172. Bernardi, S. *et al.* TNF-related apoptosis-inducing ligand significantly attenuates metabolic abnormalities in high-fat-fed mice reducing adiposity and systemic inflammation. *Clin. Sci. (Lond)*. **123**, 547–555 (2012).
 173. Harith, H. H. *et al.* On the TRAIL of obesity and diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 578–587 (2013).
 174. Keuper, M. *et al.* TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) regulates adipocyte metabolism by caspase-mediated cleavage of PPAR γ . *Cell Death Dis.* **4**, e474 (2013).
 175. Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M. & Cohen, P. L. Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction. *J. Immunol.* **189**, 3508–3520 (2012).
 176. Ledoux, S. *et al.* Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes* **57**, 3247–3257 (2008).
 177. Tang, W. *et al.* White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* **322**, 583–586 (2008).
 178. Powell, K. Obesity: the two faces of fat. *Nature* **447**, 525–527 (2007).
 179. Hausman, G. J. & Richardson, R. L. Adipose tissue angiogenesis. *J. Anim. Sci.* **82**, 925–934 (2004).
 180. Wang, S. *et al.* Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 7738–7743 (2008).

181. Sung, H.-K. *et al.* Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab.* **17**, 61–72 (2013).
182. Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. & Zaidi, N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* **63**, 895–902 (2014).
183. Farese, R. V., Zechner, R., Newgard, C. B. & Walther, T. C. The Problem of Establishing Relationships between Hepatic Steatosis and Hepatic Insulin Resistance. *Cell Metab.* **15**, 570–573 (2012).
184. Loomba, R. & Sanyal, A. J. The global NAFLD epidemic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 686–690 (2013).
185. Boden, G. *et al.* Insulin resistance is associated with diminished endoplasmic reticulum stress responses in adipose tissue of healthy and diabetic subjects. *Diabetes* **63**, 2977–2983 (2014).
186. Pereira, S. *et al.* In vivo effects of polyunsaturated, monounsaturated, and saturated fatty acids on hepatic and peripheral insulin sensitivity. *Metabolism.* **64**, 315–322 (2015).
187. Boon, J. *et al.* Ceramides Contained in LDL Are Elevated in Type 2 Diabetes and Promote Inflammation and Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Diabetes* **62**, 401–410 (2013).
188. Lodhi, I. J. *et al.* Inhibiting Adipose Tissue Lipogenesis Reprograms Thermogenesis and PPAR γ Activation to Decrease Diet-induced Obesity. *Cell Metab.* **16**, 189–201 (2012).
189. Minehira, K., Vega, N., Vidal, H., Acheson, K. & Tappy, L. Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. *Int. J. Obes.* **28**, 1291–1298 (2004).
190. Unger, R. H., Clark, G. O., Scherer, P. E. & Orci, L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 209–214 (2010).
191. Ortega, F. J. *et al.* The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity (Silver Spring)*. **18**, 13–20 (2010).
192. Poulain-Godefroy, O., Lecoœur, C., Pattou, F., Fruhbeck, G. & Froguel, P. Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R1–R7 (2008).



193. Chen, J. *et al.* Identifying candidate genes for Type 2 Diabetes Mellitus and obesity through gene expression profiling in multiple tissues or cells. *J. Diabetes Res.* **2013**, 970435 (2013).
194. Keller, M. P. & Attie, A. D. Physiological Insights Gained from Gene Expression Analysis in Obesity and Diabetes. *Annu Rev Nutr* **30**, 341–364 (2010).
195. Cock, T.-A., Houten, S. M. & Auwerx, J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: too much of a good thing causes harm. *EMBO Rep.* **5**, 142–147 (2004).
196. Macias-Gonzalez, M. *et al.* PPARgamma mRNA expression is reduced in peripheral blood mononuclear cells after fat overload in patients with metabolic syndrome. *J. Nutr.* **138**, 903–907 (2008).
197. Rodriguez-Cuenca, S. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Dependent Regulation of Lipolytic Nodes and Metabolic Flexibility. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1555–1565 (2012).
198. Garcia-Fuentes, E. *et al.* PPAR γ Expression After a High-fat Meal Is Associated With Plasma Superoxide Dismutase Activity in Morbidly Obese Persons. *Obesity* **18**, 952–958 (2010).
199. Macias-Gonzalez, M., Moreno-Santos, I., García-Almeida, J. M., Tinahones, F. J. & Garcia-Fuentes, E. PPAR γ 2 protects against obesity by means of a mechanism that mediates insulin resistance. *Eur. J. Clin. Invest.* **39**, 972–979 (2009).
200. Spiegelman, B. M. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* **47**, 507–514 (1998).
201. Makowski, L. & Hotamisligil, G. S. Fatty acid binding proteins--the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J. Nutr.* **134**, 2464S–2468S (2004).
202. Queipo-Ortuño, M. I. *et al.* FABP4 Dynamics in Obesity: Discrepancies in Adipose Tissue and Liver Expression Regarding Circulating Plasma Levels. *PLoS One* **7**, e48605 (2012).
203. Virtue, S. & Vidal-Puig, A. It's Not How Fat You Are, It's What You Do with It That Counts. *PLoS Biol.* **6**, e237 (2008).
204. Després, J.-P. & Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**, 881–887 (2006).
205. Sims, E. A. Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism.* **50**, 1499–1504 (2001).

206. Muñoz-Garach, A., Cornejo-Pareja, I. & Tinahones, F. J. Does Metabolically Healthy Obesity Exist? *Nutrients* **8**, E320 (2016).
207. Rey-López, J. P., de Rezende, L. F., Pastor-Valero, M. & Tess, B. H. The prevalence of metabolically healthy obesity: a systematic review and critical evaluation of the definitions used. *Obes. Rev.* **15**, 781–790 (2014).
208. Blüher, S. & Schwarz, P. Metabolically healthy obesity from childhood to adulthood - Does weight status alone matter? *Metabolism*. **63**, 1084–92 (2014).
209. Badoud, F., Perreault, M., Zulyniak, M. A. & Mutch, D. M. Molecular insights into the role of white adipose tissue in metabolically unhealthy normal weight and metabolically healthy obese individuals. *FASEB J.* **29**, 748–758 (2015).
210. Blüher, M. The distinction of metabolically ‘healthy’ from ‘unhealthy’ obese individuals. *Curr. Opin. Lipidol.* **21**, 38–43 (2010).
211. Patel, P. & Abate, N. Body fat distribution and insulin resistance. *Nutrients* **5**, 2019–2027 (2013).
212. Barnes, A. S. The epidemic of obesity and diabetes: trends and treatments. *Texas Hear. Inst. J.* **38**, 142–144 (2011).
213. Rosario Serrano, C. Cohort Study in Primary Health Care on the Evolution of Patients with Prediabetes (PREDAPS). Basis and Methodology. *Rev Esp Salud Publica* **87**, 121–135 (2013).
214. Lee, S.-H. *et al.* Identifying metabolically obese but normal-weight (MONW) individuals in a nondiabetic Korean population: the Chungju Metabolic disease Cohort (CMC) study. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **75**, 475–481 (2011).
215. Marques-Vidal, P. *et al.* Normal weight obesity: relationship with lipids, glycaemic status, liver enzymes and inflammation. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **20**, 669–675 (2010).
216. Ruderman, N., Chisholm, D., Pi-Sunyer, X. & Schneider, S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes* **47**, 699–713 (1998).
217. Wildman, R. P. *et al.* The Obese Without Cardiometabolic Risk Factor Clustering and the Normal Weight With Cardiometabolic Risk Factor Clustering. *Arch. Intern. Med.* **168**, 1617–1624 (2008).
218. Shea, J. L., Randell, E. W. & Sun, G. The Prevalence of Metabolically Healthy Obese Subjects Defined by BMI and Dual-Energy X-Ray Absorptiometry. *Obesity* **19**, 624–630 (2011).
219. Pajunen, P. *et al.* Metabolically healthy and unhealthy obesity phenotypes in the

- general population: the FIN-D2D Survey. *BMC Public Health* **11**, 754 (2011).
220. van Vliet-Ostaptchouk, J. V. *et al.* The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocr. Disord.* **14**, 9 (2014).
 221. Jean, N. *et al.* Normal-Weight Obesity: Implications for Cardiovascular Health. *Curr. Atheroscler. Rep.* **16**, 464 (2014).
 222. Oliveros, E., Somers, V. K., Sochor, O., Goel, K. & Lopez-Jimenez, F. The concept of normal weight obesity. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **56**, 426–433
 223. Gomez-Huelgas, R. *et al.* Prevalence of metabolically discordant phenotypes in a mediterranean population-The IMAP study. *Endocr. Pract.* **19**, 758–768
 224. Soriguer, F. *et al.* Metabolically Healthy but Obese, a Matter of Time? Findings From the Prospective Pizarra Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 2318–2325 (2013).
 225. Karelis, A. D. *et al.* The Metabolically Healthy but Obese Individual Presents a Favorable Inflammation Profile. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 4145–4150 (2005).
 226. Stefan, N. *et al.* Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch. Intern. Med.* **168**, 1609–1616 (2008).
 227. Bobbioni-Harsch, E. *et al.* From Metabolic Normality to Cardiometabolic Risk Factors in Subjects With Obesity. *Obesity* **20**, 2063–2069 (2012).
 228. Aguilar-Salinas, C. A. *et al.* High Adiponectin Concentrations Are Associated with the Metabolically Healthy Obese Phenotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 4075–4079 (2008).
 229. Messier, V. *et al.* Identifying Metabolically Healthy but Obese Individuals in Sedentary Postmenopausal Women. *Obesity* **18**, 911–917 (2010).
 230. Roberson, L. L. *et al.* Beyond BMI: The “Metabolically healthy obese” phenotype & its association with clinical/subclinical cardiovascular disease and all-cause mortality -- a systematic review. *BMC Public Health* **14**, 14 (2014).
 231. Phillips, C. M. *et al.* Defining Metabolically Healthy Obesity: Role of Dietary and Lifestyle Factors. *PLoS One* **8**, e76188 (2013).
 232. Karelis, A. D. & Rabasa-Lhoret, R. Obesity: Can inflammatory status define metabolic health? *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**, 694–695 (2013).
 233. Mathis, D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab.* **17**, 851–859 (2013).
 234. Chawla, A., Nguyen, K. D. & Goh, Y. P. S. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 738–749 (2011).

235. Amano, S. U. *et al.* Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab.* **19**, 162–171 (2014).
236. Oh, D. Y., Morinaga, H., Talukdar, S., Bae, E. J. & Olefsky, J. M. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes* **61**, 346–354 (2012).
237. Bourlier, V. *et al.* Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* **117**, 806–815 (2008).
238. Fabbrini, E. *et al.* Association between specific adipose tissue CD4⁺ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. *Gastroenterology* **145**, 366–374 (2013).
239. Esser, N. *et al.* Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia* **56**, 2487–2497 (2013).
240. Sutherland, J. P., McKinley, B. & Eckel, R. H. The metabolic syndrome and inflammation. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2**, 82–104 (2004).
241. DeBoer, M. D. *et al.* Obesity, systemic inflammation, and increased risk for cardiovascular disease and diabetes among adolescents: a need for screening tools to target interventions. *Nutrition* **29**, 379–386 (2013).
242. Phillips, C. M. & Perry, I. J. Does Inflammation Determine Metabolic Health Status in Obese and Nonobese Adults? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E1610–E1619 (2013).
243. Hyun, Y. J. *et al.* Atherogenicity of LDL and Unfavorable Adipokine Profile in Metabolically Obese, Normal-weight Woman. *Obesity* **16**, 784–789 (2008).
244. Di Renzo, L. *et al.* Oxidative stress in normal-weight obese syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. **18**, 2125–2130 (2010).
245. De Lorenzo, A. *et al.* Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 40–45 (2007).
246. Di Renzo, L. *et al.* Association between -308 G/A TNF- α polymorphism and appendicular skeletal muscle mass index as a marker of sarcopenia in normal weight obese syndrome. *Dis. Markers* **35**, 615–623 (2013).
247. van Beek, L. *et al.* Increased systemic and adipose tissue inflammation differentiates obese women with T2DM from obese women with normal glucose tolerance. *Metabolism*. **63**, 492–501 (2014).
248. Barbarroja, N. *et al.* The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochem. J.* **430**, 141–149 (2010).
249. Cipolletta, D. *et al.* PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of

- adipose tissue Treg cells. *Nature* **486**, 549–553 (2012).
250. Lionetti, L. *et al.* From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **19**, 146–52 (2009).
 251. Arner, E. *et al.* Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes* **59**, 105–109 (2009).
 252. Barbarroja, N. *et al.* Increased dihydroceramide/ceramide ratio mediated by defective expression of degs1 impairs adipocyte differentiation and function. *Diabetes* **64**, 1180–1192 (2014).
 253. Clemente-Postigo, M. *et al.* Adipose Tissue Gene Expression of Factors Related to Lipid Processing in Obesity. *PLoS One* **6**, e24783 (2011).
 254. Cao, Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 107–115 (2010).
 255. Tinahones, F. *et al.* Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. *BMC Physiol.* **12**, 4 (2012).
 256. Ruderman, B. & Schneider, H. The ‘metabolically-obese,’ normal-weight individual. *Diabetes* **34**, 1617–1621 (1981).
 257. Blüher, M. *et al.* Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 163–177 (2013).
 258. Ortega, F. B. *et al.* The intriguing metabolically healthy but obese phenotype: cardiovascular prognosis and role of fitness. *Eur. Heart J.* **34**, 389–397 (2013).
 259. Katzmarzyk, P. T., Church, T. S., Janssen, I., Ross, R. & Blair, S. N. Metabolic Syndrome, Obesity, and Mortality. *Diabetes Care* **28**, 391–397. (2005).
 260. Larsson, C. A. *et al.* Leisure time and occupational physical activity in relation to obesity and insulin resistance: a population-based study from the Skaraborg Project in Sweden. *Metabolism.* **61**, 590–598 (2012).
 261. Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10513–10518 (2008).
 262. Zhang, T. *et al.* Plasma miR-126 is a potential biomarker for early prediction of type 2 diabetes mellitus in susceptible individuals. *Biomed Res. Int.* **2013**, 761617 (2013).
 263. Lakowa, N. *et al.* Telomere length differences between subcutaneous and visceral adipose tissue in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **457**, 426–432 (2015).
 264. Valdes, A. M. *et al.* Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet (London, England)* **366**, 662–664 (2003).

265. Moreno-Navarrete, J. M. *et al.* Telomere length of subcutaneous adipose tissue cells is shorter in obese and formerly obese subjects. *Int. J. Obes.* **34**, 1345–1348 (2010).
266. Rode, L., Nordestgaard, B. G., Weischer, M. & Bojesen, S. E. Increased Body Mass Index, Elevated C-reactive Protein, and Short Telomere Length. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, E1671–E1675 (2014).
267. García-Calzón, S. *et al.* Longitudinal association of telomere length and obesity indices in an intervention study with a Mediterranean diet: the PREDIMED-Navarra trial. *Int. J. Obes. (Lond)*. **38**, 177–182 (2014).
268. Xu, W.-T., Nie, Y.-Z., Yang, Z. & Lu, N.-H. The crosstalk between gut microbiota and obesity and related metabolic disorders. *Future Microbiol.* **11**, 825–836 (2016).
269. Cani, P. D. *et al.* Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* **56**, 1761–1772 (2007).
270. Moreno-Indias, I., Cardona, F., Tinahones, F. J. & Queipo-Ortuño, M. I. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front. Microbiol.* **5**, 190 (2014).
271. Sommer, F. *et al.* The Gut Microbiota Modulates Energy Metabolism in the Hibernating Brown Bear *Ursus arctos*. *Cell Rep.* **14**, 1655–1661 (2016).
272. Arsenault, B. J. *et al.* Effect of exercise training on cardiometabolic risk markers among sedentary, but metabolically healthy overweight or obese post-menopausal women with elevated blood pressure. *Atherosclerosis* **207**, 530–533 (2009).
273. Janiszewski, P. M. & Ross, R. Effects of Weight Loss Among Metabolically Healthy Obese Men and Women. *Diabetes Care* **33**, 1957–1959. (2010).
274. Karelis, A. D., Messier, V., Brochu, M. & Rabasa-Lhoret, R. Metabolically healthy but obese women: effect of an energy-restricted diet. *Diabetologia* **51**, 1752–1754 (2008).
275. Dalzell, C. *et al.* Intensive lifestyle intervention improves cardiometabolic and exercise parameters in metabolically healthy obese and metabolically unhealthy obese individuals. *Can. J. Cardiol.* **30**, 434–440 (2014).
276. Martínez-González, M. A. *et al.* Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **58**, 50–60 (2015).
277. Samaropoulos, X. F. *et al.* A metabolically healthy obese phenotype in hispanic participants in the IRAS family study. *Obesity* **21**, 2303–2309 (2013).
278. Buchwald, H. *et al.* Bariatric Surgery. *JAMA* **292**, 1724–1737. (2004).
279. Hinnouho, G.-M. *et al.* Metabolically healthy obesity and the risk of cardiovascular



- disease and type 2 diabetes: the Whitehall II cohort study. *Eur. Heart J.* **36**, 551–559 (2015).
280. Hwang, Y.-C. *et al.* Visceral abdominal fat accumulation predicts the conversion of metabolically healthy obese subjects to an unhealthy phenotype. *Int. J. Obes.* **39**, 1365–1370 (2015).
 281. Song, Y. *et al.* Comparison of usefulness of body mass index versus metabolic risk factors in predicting 10-year risk of cardiovascular events in women. *Am. J. Cardiol.* **100**, 1654–1658 (2007).
 282. Meigs, J. B. *et al.* Body Mass Index, Metabolic Syndrome, and Risk of Type 2 Diabetes or Cardiovascular Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 2906–2912 (2006).
 283. Calori, G. *et al.* Prevalence, Metabolic Features, and Prognosis of Metabolically Healthy Obese Italian Individuals. *Diabetes Care* **34**, 210–215 (2010).
 284. Ogorodnikova, A. D. *et al.* Incident Cardiovascular Disease Events in Metabolically Benign Obese Individuals. *Obesity* **20**, 651–659 (2012).
 285. Ärnlov, J., Ingelsson, E., Sundström, J. & Lind, L. Impact of Body Mass Index and the Metabolic Syndrome on the Risk of Cardiovascular Disease and Death in Middle-Aged Men. *Circulation* **121**, 230–236 (2010).
 286. Flint, A. J. *et al.* Excess weight and the risk of incident coronary heart disease among men and women. *Obesity (Silver Spring)*. **18**, 377–383 (2010).
 287. Kramer, C. K., Zinman, B. & Retnakaran, R. Are Metabolically Healthy Overweight and Obesity Benign Conditions? *Ann. Intern. Med.* **159**, 758 (2013).
 288. Shaharyar, S. *et al.* Obesity and Metabolic Phenotypes (Metabolically Healthy and Unhealthy Variants) Are Significantly Associated with Prevalence of Elevated C-Reactive Protein and Hepatic Steatosis in a Large Healthy Brazilian Population. *J. Obes.* **2015**, 1–6 (2015).
 289. Eshtiaghi, R., Keihani, S., Hosseinpanah, F., Barzin, M. & Azizi, F. Natural course of metabolically healthy abdominal obese adults after 10 years of follow-up: the Tehran Lipid and Glucose Study. *Int. J. Obes.* **39**, 514–519 (2015).
 290. Blüher, M. Adipose Tissue Dysfunction in Obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. & Diabetes* **117**, 241–250 (2009).
 291. Bastien, M. *et al.* Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity to Cardiovascular Disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **56**, 369–381 (2014).
 292. Katsuki, A. *et al.* Increased visceral fat and serum levels of triglyceride are associated with insulin resistance in Japanese metabolically obese, normal weight subjects with

- normal glucose tolerance. *Diabetes Care* **26**, 2341–2344 (2003).
293. Tchernof, A. *et al.* Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.* **93**, 359–404 (2013).
 294. Gagnon, A., Foster, C., Landry, A. & Sorisky, A. The role of interleukin 1 β in the anti-adipogenic action of macrophages on human preadipocytes. *J. Endocrinol.* **217**, 197–206 (2013).
 295. Permana, P. A., Menge, C. & Reaven, P. D. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 507–514 (2006).
 296. Nishimura, S. *et al.* CD8 $^{+}$ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* **15**, 914–920 (2009).
 297. Pereira, S. *et al.* Modulation of adipose tissue inflammation by FOXP3 $^{+}$ Treg cells, IL-10, and TGF- β in metabolically healthy class III obese individuals. *Nutrition* **30**, 784–790 (2014).
 298. Morris, D. L., Singer, K. & Lumeng, C. N. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **14**, 341–6 (2011).
 299. Lumeng, C. N. *et al.* Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184 (2007).
 300. Fjeldborg, K. *et al.* Human Adipose Tissue Macrophages Are Enhanced but Changed to an Anti-Inflammatory Profile in Obesity. *J. Immunol. Res.* **2014**, 1–10 (2014).
 301. Chinetti-Gbaguidi, G. & Staels, B. Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 365–372 (2011).
 302. Montecucco, F. *et al.* C-reactive protein (CRP) induces chemokine secretion via CD11b/ICAM-1 interaction in human adherent monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 1109–1119 (2008).
 303. Spencer, M. *et al.* Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E1016–E1027 (2010).
 304. Ahlin, S. *et al.* Macrophage Gene Expression in Adipose Tissue is Associated with Insulin Sensitivity and Serum Lipid Levels Independent of Obesity. *Obesity* **21**, E571–E576 (2013).
 305. He, J. *et al.* Markers of adipose tissue macrophage content are negatively associated

- with serum HDL-C concentrations. *Atherosclerosis* **215**, 243–246 (2011).
306. De Nardo, D. *et al.* High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat. Immunol.* **15**, 152–160 (2014).
 307. Al-Daghri, N. M. *et al.* Soluble CD163 is associated with body mass index and blood pressure in hypertensive obese Saudi patients. *Eur. J. Clin. Invest.* **42**, 1221–1226 (2012).
 308. Alipour, A. *et al.* Leukocyte Activation by Triglyceride-Rich Lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 792–797 (2008).
 309. Huang, S. C.-C. *et al.* Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat. Immunol.* **15**, 846–855 (2014).
 310. Badoud, F. *et al.* Serum and Adipose Tissue Amino Acid Homeostasis in the Metabolically Healthy Obese. *J. Proteome Res.* **13**, 3455–3466 (2014).
 311. Nagy, Z. S., Czimmerer, Z., Szanto, A. & Nagy, L. Pro-inflammatory cytokines negatively regulate PPAR γ mediated gene expression in both human and murine macrophages via multiple mechanisms. *Immunobiology* **218**, 1336–1344 (2013).
 312. Odegaard, J. I. *et al.* Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116–1120 (2007).
 313. Stienstra, R. *et al.* Peroxisome Proliferator-activated Receptor Activation Promotes Infiltration of Alternatively Activated Macrophages into Adipose Tissue. *J. Biol. Chem.* **283**, 22620–22627 (2008).
 314. Ricote, M. *et al.* Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7614–7619 (1998).
 315. Nagy, L. *et al.* Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response. *Physiol. Rev.* **92**, 739–789 (2012).
 316. Charo, I. F. *et al.* Macrophage Polarization and Insulin Resistance: PPAR γ in Control. *Cell Metab.* **6**, 96–98 (2007).
 317. Tchkonja, T. *et al.* Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**, E267–E277 (2005).
 318. Wei, P. Expression of Adipose Differentiation-Related Protein (ADRP) Is

- Conjointly Regulated by PU.1 and AP-1 in Macrophages. *J. Biochem.* **138**, 339–412 (2005).
319. Takada, I., Kouzmenko, A. P. & Kato, S. PPAR-gamma signaling crosstalk in mesenchymal stem cells. *PPAR Res.* **2010**, 341671 (2010).
 320. Vergès, B. *et al.* Clinical interest of PPARs ligands. *Diabetes Metab.* **30**, 7–12 (2004).
 321. Fournier, N. *et al.* Fibrate treatment induced quantitative and qualitative HDL changes associated with an increase of SR-BI cholesterol efflux capacities in rabbits. *Biochimie* **95**, 1278–1287 (2013).
 322. Chinetti, G. *et al.* PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat. Med.* **7**, 53–58 (2001).
 323. Sayers, M. H., English, G. & Finch, C. Capacity of the store-regulator in maintaining iron balance. *Am. J. Hematol.* **47**, 194–197 (1994).
 324. de Oliveira Otto, M. C. *et al.* Dietary intakes of zinc and heme iron from red meat, but not from other sources, are associated with greater risk of metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J. Nutr.* **142**, 526–533 (2012).
 325. Aigner, E., Feldman, A. & Datz, C. Obesity as an emerging risk factor for iron deficiency. *Nutrients* **6**, 3587–3600 (2014).
 326. Jeon, Y. J. *et al.* Serum ferritin level is higher in male adolescents with obesity: results from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2010. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **18**, 141–147 (2013).
 327. Yu, Y. & Song, Y. Three clustering patterns among metabolic syndrome risk factors and their associations with dietary factors in Korean adolescents: based on the Korea National Health and Nutrition Examination Survey of 2007–2010. *Nutr. Res. Pract.* **9**, 199–206 (2015).
 328. Jin, Y., He, L., Chen, Y., Fang, Y. & Yao, Y. Association between serum ferritin levels and metabolic syndrome: an updated meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* **8**, 13317–13322 (2015).
 329. Padwal, M. K., Murshid, M., Nirmale, P. & Melinkeri, R. R. Association of Serum Ferritin Levels with Metabolic Syndrome and Insulin Resistance. *J Clin Diagn Res* **9**, Bc11–13 (2015).
 330. Escobar-Morreale, H. F. *et al.* Body iron stores are increased in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* **28**, 2042–2044 (2005).
 331. Sun, L. *et al.* Ferritin concentrations, metabolic syndrome, and type 2 diabetes in

- middle-aged and elderly chinese. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 4690–4696 (2008).
332. Chang, J.-S. *et al.* Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome: a population-based study. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **22**, 400–407 (2013).

ANEXOS

Biobanco Hospitalario Virgen de la Victoria

Campus Teatinos s/n, Servicio de Anatomía Patológica, tlfno: 951-032-566

biobanco.hvv.sspa@juntadeandalucia.es

FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Este documento sirve para que usted otorgue su consentimiento para donar sus muestras biológicas, o las del sujeto al que representa, al Biobanco indicado, establecimiento público, sin ánimo de lucro, dependiente de la Consejería de Salud/del Servicio Andaluz de Salud, que acoge colecciones de muestras biológicas concebidas con fines diagnósticos o de investigación biomédica y organizadas como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino, donde serán conservadas hasta que se agoten por su uso, salvo que usted solicitara su eliminación. Las muestras biológicas son un excelente elemento para la investigación de enfermedades. A través de dichas investigaciones se podrán obtener datos que permitirán mejorar el conocimiento sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de multitud de enfermedades.

Esta hoja de información puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pídale al profesional sanitario que le explique la información que no comprenda. Tómese el tiempo necesario para decidir si quiere o no donar su muestra biológica y consulte a personas de su confianza si lo desea. Para consultas que desee plantear posteriormente, podrá dirigirse al Biobanco, a la dirección de correo electrónico: **biobanco.hvv.sspa@juntadeandalucia.es**

Las muestras biológicas donadas y sus datos clínicos asociados se utilizarán de conformidad con lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (en adelante Ley de Investigación biomédica).

Es posible que la información obtenida de las investigaciones en las que se utilicen sus muestras no le genere un beneficio directo, pero habrá contribuido al avance de la medicina y del conocimiento de diversas enfermedades, lo que supondrá, sin duda, un beneficio para la sociedad.

La donación es voluntaria y altruista, por lo que usted no tendrá derecho alguno sobre los resultados que pudieran derivarse de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras, de conformidad con la normativa vigente. Su decisión de donar o no, no afectará negativamente a su asistencia sanitaria. En el apartado dedicado al consentimiento, podrá decidir si quiere que sus muestras se conserven de forma codificada (en cuyo caso se identifican con un código que protege su identidad) o anonimizada (eliminandose de forma irreversible toda vinculación con su identidad).

Sus muestras y los datos asociados a las mismas sólo se cederán a terceros que las utilicen en investigación biomédica de manera anónima o disociada. Si, por la naturaleza del proyecto de investigación en el que se utilizara su muestra se necesitaran datos clínicos adicionales, el Biobanco coordinaría la obtención de los mismos, siempre que la muestra no hubiera sido anonimizada.

1. LO QUE USTED DEBE SABER:

1.1. Obtención de las muestras

Las muestras serán obtenidas durante el procedimiento médico-quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido durante su proceso asistencial, o a través de un procedimiento expreso para obtenerla, según lo indicado en el apartado sobre consentimiento.

En el caso de que usted done las muestras obtenidas durante un procedimiento médico-quirúrgico asistencial, no existe ningún inconveniente adicional derivado de la donación de las mismas.

Si, por el contrario, las muestras fueran extraídas expresamente para la donación para investigación biomédica podrían existir inconvenientes vinculados con la obtención de las mismas, de las que será convenientemente informado en la hoja de información del procedimiento correspondiente.

1.2. Utilización de las muestras

Usted autoriza a que las muestras donadas sean utilizadas en investigación biomédica, pudiendo establecer restricciones a su utilización.

Las muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación científicamente avalados, que cumplan las exigencias legales y los principios éticos que rigen la investigación en salud y que sean autorizados por los órganos competentes, de conformidad con lo establecido en la normativa vigente.

Cuando, por razones de salud, usted o su familia lo necesiten, podrán hacer uso de las muestras, siempre que no se hayan agotado o eliminado y no se encuentren anonimadas.

Biobanco Hospitalario Virgen de la Victoria

Campus Teatinos s/n, Servicio de Anatomía Patológica, tlfno: 951-032-566

biobanco.hvv.sspa@juntadeandalucia.es

1.3. Información relacionada con las muestras

Si lo solicita, el Biobanco le facilitará la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras donadas, si éstas no hubieran sido anonimizadas.

Al donar sus muestras al Biobanco, en este momento puede no saberse el lugar de realización de los análisis. El Biobanco mantiene un registro detallado del lugar de realización de los análisis realizados.

La información que se obtenga puede tener implicaciones para sus familiares, por lo que debe transmitirles dicha información.

1.4. Posibilidad de ponerse nuevamente en contacto

Puede que sea necesario ponerse en contacto nuevamente con usted, con el fin de recabar datos o muestras adicionales, o proporcionarle la información relevante para su salud, salvo que haya solicitado que las muestras sean anonimizadas.

1.5. Protección de datos y confidencialidad de la información

La información proporcionada en este apartado será aplicable siempre que sus muestras no se encuentren anonimizadas.

Los datos personales recabados serán confidenciales y tratados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y su normativa de desarrollo, y la Ley de Investigación biomédica.

Sus datos de carácter personal serán incorporados a un fichero automatizado, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, cuya titularidad corresponde al Servicio Andaluz de Salud. Sólo los responsables del Biobanco podrán identificar a quién corresponde cada muestra o dato, si no está anonimizada.

Podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos personales, reconocidos en la citada Ley Orgánica 15/1999, con las limitaciones establecidas en dicha Ley. Para ello, deberá dirigirse a la Dirección General de Asistencia Sanitaria del Servicio Andaluz de Salud, Avenida de la Constitución, núm. 18, de Sevilla.

1.6. Derecho de revocación del consentimiento

Salvo que sus muestras se encuentren anonimizadas, podrá revocar o retirar, en cualquier momento, el consentimiento prestado. Para ello, deberá dirigirse al Biobanco, pudiendo solicitar la eliminación o la anonimización de las muestras.

Los efectos de la revocación no se extenderán a los resultados de las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad.

1.7. Información relativa a análisis genéticos

Salvo que usted manifieste lo contrario en el apartado dedicado al consentimiento, se podrán realizar análisis genéticos.

Excepto si sus muestras son anonimizadas, tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, así como de la información relativa a su salud derivada de dichos análisis, según los términos en que exprese su voluntad en el apartado del consentimiento.

Si no desea recibir dicha información y ésta fuera necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar o a un representante. La comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para evitar tal perjuicio.

1.8. Otras consideraciones

Una vez informado/a de los aspectos relacionados anteriormente en este documento, si decide donar dichas muestras deberá firmar el consentimiento informado para la donación.

Biobanco Hospitalario Virgen de la Victoria

Campus Teatinos s/n, Servicio de Anatomía Patológica, tlfno: 951-032-566

biobanco.hvv.sspa@juntadeandalucia.es

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

COPIA PARA EL PACIENTE

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

DNI / NIE: **nuhsa:**

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre	Fecha	Firma
--------------------	-------	-------

.....

CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que **he leído y comprendido el Formulario de Información**, del que se me ha entregado un ejemplar.

He **recibido suficiente información** sobre la donación de muestras biológicas de..... al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

- Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido
- Tomadas mediante el procedimiento expreso.....

Asimismo, consiento el **tratamiento de los datos clínicos asociados** a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

☐ **Codificada** (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o

☐ **Anonimizada** (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo **establecer restricciones** respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en

Autorizo que se pueda **contactar conmigo posteriormente:** SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:.....

Autorizo **recibir información** sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo **revocar**, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En , a de de

EL/LA DONANTE EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

Biobanco Hospitalario Virgen de la Victoria

Campus Teatinos s/n, Servicio de Anatomía Patológica, tlfno: 951-032-566

biobanco.hvv.sspa@juntadeandalucia.es

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA USO DE MUESTRAS DONADAS:

Yo, D./Dña.

revoco el consentimiento informado otorgado en el documento

.....
(especificar fecha aproximada y/o procedimiento).

Solicito:

La eliminación de las muestras donadas

La anonimización de las mismas

Otras consideraciones:

.....
.....
.....

En , a de de

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

Biobanco Hospitalario Virgen de la Victoria

Campus Teatinos s/n, Servicio de Anatomía Patológica, tlfno: 951-032-566

biobanco.hvv.sspa@juntadeandalucia.es

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

COPIA PARA LA HISTORIA CLÍNICA

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

DNI / NIE: **nuhsa:**

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre	Fecha	Firma
--------------------	-------	-------

.....

CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que **he leído y comprendido el Formulario de Información**, del que se me ha entregado un ejemplar.

He **recibido suficiente información** sobre la donación de muestras biológicas de.....
al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

-Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido

- Tomadas mediante el procedimiento expreso.....

Asimismo, consiento el **tratamiento de los datos clínicos asociados** a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

☐ **Codificada** (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o

☐ **Anonimizada** (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo **establecer restricciones** respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en

Autorizo que se pueda **contactar conmigo posteriormente:** SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:.....

Autorizo **recibir información** sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo **revocar**, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En , a de de

EL/LA DONANTE EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

Biobanco Hospitalario Virgen de la Victoria

Campus Teatinos s/n, Servicio de Anatomía Patológica, tlfno: 951-032-566

biobanco.hvv.sspa@juntadeandalucia.es

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA USO DE MUESTRAS DONADAS:

Yo, D./Dña.

revoco el consentimiento informado otorgado en el documento

.....
(especificar fecha aproximada y/o procedimiento).

Solicito:

La eliminación de las muestras donadas

La anonimización de las mismas

Otras consideraciones:

.....
.....
.....

En , a de de

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

Biobanco Hospitalario Virgen de la Victoria

Campus Teatinos s/n, Servicio de Anatomía Patológica, tlfno: 951-032-566

biobanco.hvv.sspa@juntadeandalucia.es

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

COPIA PARA EL BIOBANCO

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

DNI / NIE: **nuhsa:**

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre	Fecha	Firma
.....

CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que **he leído y comprendido el Formulario de Información**, del que se me ha entregado un ejemplar.

He **recibido suficiente información** sobre la donación de muestras biológicas de..... al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

-Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido

- Tomadas mediante el procedimiento expreso.....

Asimismo, consiento el **tratamiento de los datos clínicos asociados** a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

☐ **Codificada** (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o

☐ **Anonimizada** (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo **establecer restricciones** respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en

Autorizo que se pueda **contactar conmigo posteriormente**: SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:.....

Autorizo **recibir información** sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo **revocar**, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En , a de de

EL/LA DONANTE EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

Biobanco Hospitalario Virgen de la Victoria

Campus Teatinos s/n, Servicio de Anatomía Patológica, tlfno: 951-032-566

biobanco.hvv.sspa@juntadeandalucia.es

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA USO DE MUESTRAS DONADAS:

Yo, D./Dña.

revoco el consentimiento informado otorgado en el documento

.....
(especificar fecha aproximada y/o procedimiento).

Solicito:

La eliminación de las muestras donadas

La anonimización de las mismas

Otras consideraciones:

.....
.....
.....

En , a de de

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:



El Comité de Ética de la Investigación Clínica Málaga Noroeste, en su reunión extraordinaria de 18 de Abril de 2012, con la asistencia de sus miembros:

D. Javier Estebaranz García, D. Ramón Porras Sánchez, D. Pedro Valdivielso Felices, Dr. Manuel Jiménez Navarro, Dra. Carolina Conejo Gómez, Dña. M^a Isabel Lucena González, D. Adolfo Romero Ruíz, Dña. Teresa García Ballesteros, Dr. Antonio E. Guzmán Guzmán, Dr. Alberto Delgado García, Dña. Josefa Castro Barea.

Ha evaluado la propuesta para que se lleve a cabo en este centro el Proyecto de Investigación titulado *“Capacidad expansiva del tejido adiposo y su relación con la resistencia a la insulina: estudio de muerte celular programada y capacidad profibrótica y proinflamatoria de las células troncales”*.

- El estudio cumple con los requerimientos legales exigibles y el planteamiento metodológico es correcto.
- El protocolo establece claramente los objetivos.
- Los riesgos y molestias previsibles para el sujeto están definidos, acotados y justificados, con la cobertura que procede.
- Existe consentimiento informado, la hoja de información para los sujetos es comprensible y completa y se contempla el procedimiento de garantía de confidencialidad e intimidad.
- Este Comité considera que **D. Francisco Tinahones Madueño** y su equipo, están capacitados para llevar a cabo este estudio, que es de desarrollo factible en este Centro, aprobando en todos sus términos la realización del mismo.

En Málaga a 18 de Abril de 2012

EL SECRETARIO


Fdo. Alberto Delgado García



ORIGINAL ARTICLES

Adipose tissue infiltration in normal-weight subjects and its impact on metabolic function



ISABEL MORENO-INDIAS, WILFREDO OLIVA-OLIVERA, ANTONIO OMISTE,
DANIEL CASTELLANO-CASTILLO, SAID LHAMYANI, ANTONIO CAMARGO, and
FRANCISCO J. TINAHONES

MALAGA AND MADRID, SPAIN

Discordant phenotypes, metabolically healthy obese and unhealthy normal-weight individuals, are always interesting to provide important insights into the mechanistic link between adipose tissue dysfunction and associated metabolic alterations. Macrophages can release factors that impair the proper activity of the adipose tissue. Thus, studying subcutaneous and visceral adipose tissues, we investigated for the first time the differences in monocyte/macrophage infiltration, inflammation, and adipogenesis of normal-weight subjects who differed in their degree of metabolic syndrome. The study included 92 normal-weight subjects who differed in their degree of metabolic syndrome. Their anthropometric and biochemical parameters were measured. RNA from subcutaneous and visceral adipose tissues was isolated, and mRNA expression of monocyte/macrophage infiltration (CD68, CD33, ITGAM, CD163, EMR-1, CD206, MerTK, CD64, ITGAX), inflammation (IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF α), IL-10, IL-1b, CCL2, CCL3), and adipogenic and lipogenic capacity markers (PPAR γ , FABP4) were measured. Taken together, our data provide evidence of a different degree of macrophage infiltration between the adipose tissues, with a higher monocyte/macrophage infiltration in subcutaneous adipose tissue in metabolically unhealthy normal-weight subjects, whereas visceral adipose tissue remained almost unaffected. An increased macrophage infiltration of adipose tissue and its consequences, such as a decrease in adipogenesis function, may explain why both the obese and normal-weight subjects can develop metabolic diseases or remain healthy. (Translational Research 2016;172:6–17)

Abbreviations: ATMc = adipose tissue monocytes/macrophages; MH = metabolically healthy; MU = metabolically unhealthy; SAT = subcutaneous adipose tissue; VAT = visceral adipose tissue; MHO = metabolically healthy obese

From the Unidad de Gestion Clínica de Endocrinología y Nutrición, Laboratorio del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario de Málaga (Virgen de la Victoria), Malaga, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), Madrid, Spain; Lipid and Atherosclerosis Unit, IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba, Córdoba, Spain.

Submitted for publication July 31, 2015; revision submitted January 5, 2016; accepted for publication January 7, 2016.

Reprint requesters: Isabel Moreno-Indias and Francisco J. Tinahones, Teatinos s/n, Hospital Universitario de Málaga (Virgen de la Victoria), 29010, Malaga, Spain. Tel.: +34951032647; e-mail: isabel.moreno@ibima.eu, fjtinahones@uma.es.

1931-5244/\$ - see front matter

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2016.01.002>



AT A GLANCE COMMENTARY

Moreno-Indias I, et al.

Background

Discordant phenotypes study is crucial in the fight against obesity. Discordant phenotypes help to the understanding of obesity pathophysiology. Metabolically healthy obese individuals have paid a huge attention, whereas their lean counterparts have not received as much attention. This manuscript deals for the first time with the differences in macrophage infiltration between metabolically healthy and unhealthy normal-weight subjects, finding a greater infiltration in subcutaneous adipose tissue of metabolically unhealthy normal-weight subjects.

Translational significance

The importance of the visceral adipose tissue paradigm is revised. Subcutaneous adipose tissue fails before visceral adipose tissue, even before of an overweight/obesity degree, indicating body mass index is not the most relevant variable for metabolic function.

INTRODUCTION

Obesity has been related to a process of low-grade inflammation or meta-inflammation¹ leading to chronic activation of an innate immune response.² Adipose tissue has been recognized as a key regulator of energy balance, playing an active role in lipid storage. The inflammatory response is one of the main factors associated with obesity-related complications. A key feature of obesity-induced inflammation in the adipose tissue is the recruitment of immune cells, specifically macrophages.³ Obesity is associated with increased macrophage infiltration in adipose tissue.⁴ Thus, although the adipocyte is the defining cell in the adipose tissue, contributing to the production of inflammatory molecules, it appears that macrophages also contribute substantially to the inflammatory signals induced by obesity.⁴ Furthermore, macrophages can release factors that impair adipogenesis, thus predisposing to adipocyte hypertrophy and its consequences.⁵ This is the case in obese patients with metabolic disorders, in whom a decrease has been demonstrated in the lipogenic capacity of the stromal mesenchymal cells from the adipose tissue.⁶ Thus, the content of adipose tissue monocytes/macrophages (ATMs) appear to contribute critically to the metabolic syndrome and other complications of obesity.

A paradoxical but common finding in the obesity clinic is the identification of individuals who can be considered “inappropriately” healthy for their degree of obesity, with a degree of adipose tissue inflammation similar to that of normal-weight subjects,⁷ known as metabolically healthy obese (MHO) individuals. The opposite phenomenon, normal-weight individuals who have metabolic disorders usually associated with obesity, was first suggested by Ruderman et al,⁸ although previous studies suggested that normal-weight individuals with the metabolic syndrome were not rare in the general population.^{9,10}

Adipose tissue located in the viscera (VAT) is considered to be functionally and metabolically different from that found in the subcutaneous depot (SAT).^{11,12} Traditionally, VAT has been associated with the risk of metabolic and cardiovascular disease.^{13,14} Inflammatory cells such as macrophages are known to be more prevalent in visceral fat compared with subcutaneous fat.¹⁵ Macrophage functions are shaped in a very tissue- and signal-input specific manner, allowing these cells to develop extremely specific functional programs. Accepting higher complexity of macrophage activation opens new avenues toward understanding and modulating these cells in disease settings.¹⁶

The factors determining “healthy” vs “unhealthy” in normal weight and obesity remain ill defined. Discordant phenotypes are always interesting to provide important insights into the mechanistic link between the adipose tissue dysfunction and associated metabolic alterations.¹⁷ In this study of VAT and SAT, we investigated for the first time the differences in monocyte/macrophage infiltration, inflammation, and adipogenesis of normal-weight subjects who differed in their degree of metabolic syndrome.

MATERIALS AND METHODS

The study included 92 normal-weight subjects (body mass index [BMI] ≤ 25), classified according to their degree of metabolic syndrome, as defined by the Adult Treatment Panel IV criteria, into the 2 groups: metabolically healthy normal-weight (MH) subjects with 2 criteria or less for the metabolic syndrome; and metabolically unhealthy normal-weight subjects (MU) who fulfilled 3 or more criteria for the metabolic syndrome. Patients were excluded if they had cardiovascular disease, arthritis, acute inflammatory disease, infectious disease, renal disease, or were receiving drugs that could alter the lipid profile or the metabolic parameters at the time of inclusion in the study. The study was conducted in accordance with the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki. All participants gave their written informed consent and the

study was reviewed and approved by the Ethics and Research Committee. The 92 subjects (71 MH and 21 MU) were selected consecutively from patients who underwent laparoscopic surgery to undergo elective cholecystectomy or hiatal-hernia surgery during 2012 and 2013 (44 and 26 for the MH group; 12 and 9 within the MU group, respectively), excluding those patients who failed to meet the inclusion criteria or provide informed consent. All operations were programmed, none urgent. At the time of surgery, all the patients were asymptomatic. The cholecystectomy patients had not had any infectious conditions during the previous 3 months.

Anthropometric measurements and analytical determinations. The height was measured to the nearest 0.5 cm and the body weight to the nearest 0.1 kg. The BMI was calculated as weight (kilograms) divided by height (meters) squared. The waist circumference was measured midway between the lowest rib margin and the iliac crest.

Before surgery and after an overnight fast blood samples were obtained from the antecubital vein and placed in vacutainer tubes (BD vacutainer, London, UK). The serum was separated by centrifugation for 15 minutes at 4000 rpm and immediately frozen at -80°C until analysis. Serum glucose, cholesterol, triacylglycerols, and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol were measured in a Dimension autoanalyzer (Dade Behring Inc., Deerfield, Ill) by enzymatic methods (Randox Laboratories Ltd., UK). The low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was calculated from the Friedewald equation. Insulin was quantified by radioimmunoassay supplied by BioSource International, Camarillo, Calif. The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated from fasting insulin and glucose with the equation: $\text{HOMA-IR} = \text{fasting insulin } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{fasting glucose } (\text{mmol/L}) / 22.5$.

Adipose tissue samples for mRNA expression. Biopsy samples of SAT and VAT were obtained from all the subjects. Samples were obtained during hiatus-hernia repair or cholecystectomy. The biopsy samples were washed in physiological saline buffer and immediately frozen in liquid nitrogen. The biopsy samples were maintained at -80°C until analysis.

RNA isolation and mRNA gene expression. Total RNA from adipose tissues was isolated using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, GmbH, Germany) and treated with DNase (RNase-free DNase Set; Qiagen). The RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm (A260), and the purity was estimated by determining the A260/A280 ratio with Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Del). For first-strand cDNA synthesis, a constant amount of 1 μg of total RNA was reverse transcribed using random

hexamers as primers and transcriptase reverse transcriptase (Roche, Mannheim, Germany).

Gene expression was assessed by real-time polymerase chain reaction using an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time polymerase chain reaction System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The reaction was performed following the manufacturer's protocol. The cycle program consisted of an initial denaturing of 10 minutes at 95°C , then 40 cycles of 15 seconds denaturing phase at 95°C , and 1 minute annealing and extension phase at 60°C . The commercially available and prevalidated Taqman primer/probe sets used for human samples are shown in supplementary material. A threshold cycle (Ct value) was obtained for each amplification curve and a ΔCt value was first calculated by subtracting the Ct value for the corresponding endogenous control cDNA from the Ct value for each sample and transcript. Fold changes compared with the endogenous control were then determined by calculating $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed with SPSS (version 15 for Windows; SPSS, Chicago, Ill). Differences were compared using the Mann-Whitney U test with a post hoc Bonferroni correction. Spearman correlation coefficients were calculated to estimate the linear correlations between variables and the confidence interval was 95%. Stepwise multiple regression analysis was done to assess the effects of the metabolic syndrome parameters on the markers of relative expression; independent variables that correlated significantly with these markers in the univariate analyses were included in the model. Values were considered to be statistically significant when $P \leq .05$. Figures were drawn with GraphPadPrisma (GraphPad Software Inc. version 5.01 for Windows. La Jolla, Calif).

RESULTS

Anthropometric and biochemical characteristics of the patients. Table I shows the anthropometric and biochemical parameters of lean patients with or without the metabolic syndrome. Subjects were chosen with a normal BMI, without significant differences between the groups. No statistically significant difference was observed in age between the groups. The MU patients showed clear symptoms of the metabolic syndrome. For example, although they had a normal BMI, they had significantly higher glucose, triacylglycerol, C-reactive protein (CRP), total cholesterol and LDL-cholesterol levels, a higher waist circumference, and a lower HDL-cholesterol level. Moreover, these subjects also had significant higher levels of insulin and HOMA-IR.

Table I. Anthropometric and biochemical variables in metabolically healthy (MH) and metabolically unhealthy (MU) normal-weight subjects

Patients	MH	MU	P-value
n (males/females)	71 (30/41)	21 (9/12)	-
Age	46.87 ± 13.44	53.24 ± 15.09	0.149
BMI (kg/m ²)	23.40 ± 1.30	24.11 ± 1.31	0.099
Fasting glucose (mg/dL)	89.80 ± 11.36	101.24 ± 10.445	0.000
HOMA-IR score	1.76 ± 1.24	2.60 ± 1.29	0.004
TG (mg/dL)	87.85 ± 40.66	184.86 ± 73.13	0.000
Hip (cm)	94.44 ± 8.47	96.76 ± 4.38	0.139
Waist (cm)	82.30 ± 7.91	90.10 ± 5.29	0.000
Waist/Hip ratio	0.86 ± 0.08	0.92 ± 0.04	0.068
Insulin (μU/mL)	7.89 ± 4.98	10.41 ± 4.94	0.021
CRP (mg/L)	3.40 ± 2.62	9.02 ± 22.97	0.009
C Peptide (ng/mL)	1.92 ± 0.72	2.38 ± 0.558	0.028
Cholesterol (mg/dL)	202.87 ± 40.39	226.19 ± 32.82	0.024
HDL-chol (mg/dL)	59.10 ± 13.88	45.14 ± 8.32	0.000
LDL-chol (mg/dL)	124.61 ± 32.79	145.59 ± 29.52	0.015
SBP (mmHg)	119.77 ± 20.754	129.14 ± 17.48	0.175
DBP (mmHg)	75.20 ± 13.154	79.90 ± 8.75	0.216

Abbreviations: BMI, body mass index; TG, triacylglycerols; CRP, C-reactive protein; HDL-chol, HDL cholesterol; LDL-chol, LDL cholesterol; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance.

Measures of adipose tissue macrophages (ATMs) and their association with the metabolic syndrome. No single measurement fully captures the heterogeneous ATMs of an adipose tissue sample, so it is necessary to measure different markers. We performed mRNA expression analysis in a set of genes typically involved in ATMs in SAT and VAT samples from lean subjects both with and without the metabolic syndrome. ATMs were assessed measuring the relative mRNA expression of CD68, EMR1, ITGAM, CD163, and CD33, which are specific markers located on the macrophage/monocyte surface (Fig 1). As an overview, Fig 1 shows that the mRNA expression level of the SAT from the unhealthy patients differed to that from the healthy subjects. In particular, CD68, CD33, CD163, and ITGAM differed ($P < .05$) between MH and MU subjects. However, no differences were found in EMR-1. These macrophage/monocyte markers were upregulated in the MU, indicating a higher macrophage/monocyte infiltration in SAT.

Once the differences between both types of adipose tissues were established, other markers were measured to further analyze the nature of these differences. Levels of the relative mRNA expression of MerTK and CD64 were measured as more reliable markers of adipose tissue residents.¹⁸ MerTK expression level was higher in the SAT of MU patients. CD64 followed this trend without reaching statistical significance (Fig 2).

Polarization of fat macrophages was assessed by the measurement of the relative mRNA expression of ITGAX (M1) and CD206 (M2) (Fig 2). A greater expression of CD206 was detected in MU patients in SAT, whereas no differences were observed between both the groups with respect to the M1 marker, indicating the M2 nature of the resident macrophages in SAT.

When these expression levels were confronted with the metabolic syndrome parameters (See Fig S1 in Supplemental Material), CD33 was negatively associated with HDL-cholesterol ($r = -0.241$, $P < .05$), as were CD68 ($r = -0.376$, $P < .01$) and ITGAM ($r = -0.278$, $P < .05$); whereas CD163 and CD68 were positively associated with the systolic blood pressure ($r = 0.303$, $P < .05$; $r = 0.264$, $P < .05$, respectively). The triglycerides were positively associated with the expression of CD33 ($r = 0.291$, $P < .05$), ITGAM ($r = 0.299$, $P < .05$) and MerTK ($r = 0.271$, $P < .05$). Besides, glucose was related to MerTK ($r = 0.241$, $P < .05$).

On the other hand, VAT seemed to remain almost unaffected, as can be observed in Figs 1 and 2. No statistically significant differences were found between the MH and MU normal-weight subjects in this tissue. When these macrophage/monocyte gene expression levels were confronted, the relationships that emerged were in the same direction as in SAT, indicative of the nature of the markers used (data not shown).

When the expression levels of these genes measured in VAT were confronted with the metabolic syndrome parameters, there was a negative relation between EMR-1 and HDL-cholesterol ($r = -0.265$, $P < .05$) and positive relations between both CD163 and CD68 and the systolic blood pressure ($r = 0.277$, $P < .05$; $r = 0.252$, $P < .05$, respectively) as was observed in SAT. Furthermore, CD206 was related to triacylglycerols ($r = 0.233$, $P < .05$) and waist circumference ($r = 0.240$, $P < .05$) (Fig S2 in Supplemental Material).

Measures of inflammatory cytokines and their association with the metabolic syndrome. Relative mRNA expression of classical proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNFα) and IL-6 was also measured (Fig 3a) to assess the inflammation level of the adipose tissue. Neither was significantly affected ($P > .05$), although both cytokines seemed to be upregulated in the MU subjects. Moreover, a positive relationship was found between TNFα and IL-6 expression levels in both SAT and VAT (data not shown). VAT seemed to be the tissue more closely related with inflammation, and TNFα was the marker that was most influenced.

Owing to the lack of information obtained with the classical inflammation markers, other mediators of

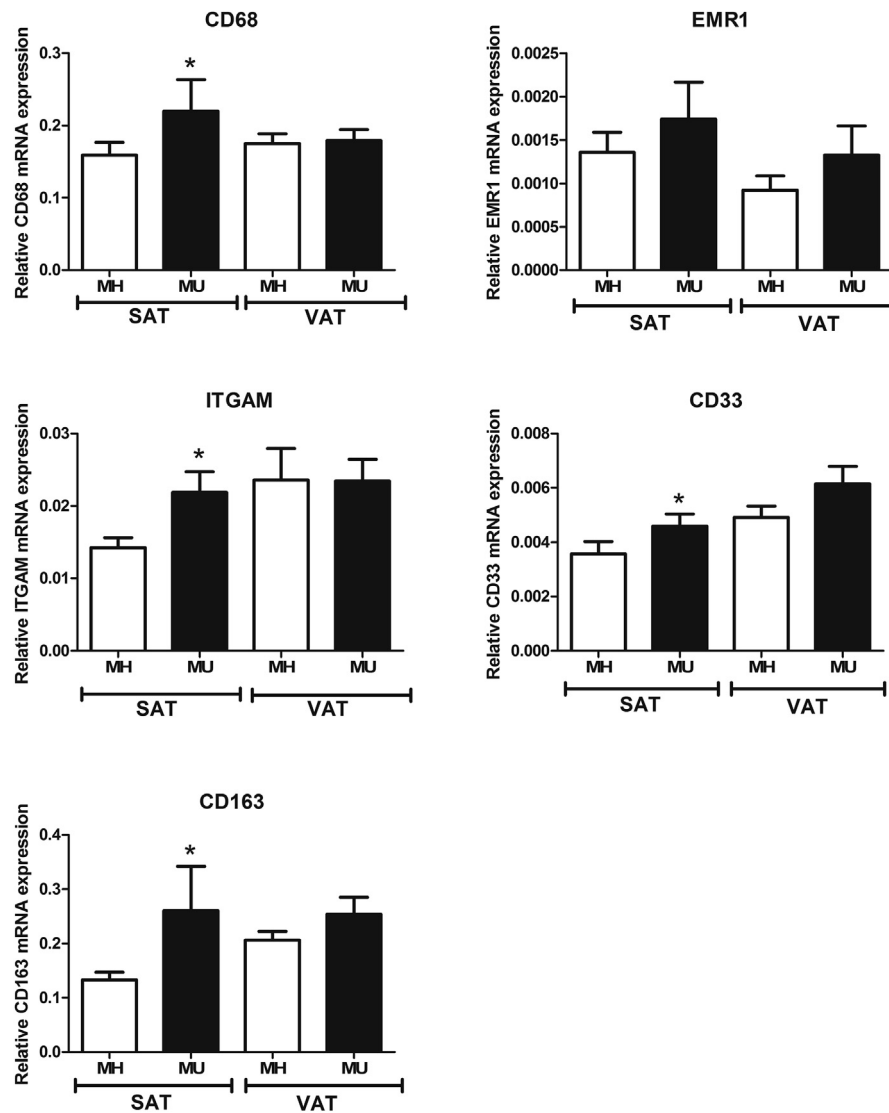


Fig 1. mRNA expression levels of monocyte/macrophage marker genes in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues in metabolically healthy (MH; in white) and unhealthy (MU; in black) normal-weight subjects (n = 92, MH = 71, MU = 21). *Groups significantly different ($P < .05$).

inflammation in adipose tissue were measured. IL-10, IL-1b, CCL2, and CCL3 relative mRNA expressions were assessed (Fig 4). Once again, neither was significantly affected ($P > .05$) in SAT or VAT, although it is necessary to mention the low level of these markers in the VAT of MU patients, another indicative of the importance of the SAT at the beginning of the disease. These inflammation markers positively correlated between themselves, indicating their relationship (data not shown).

When the level of these cytokines was compared with the metabolic syndrome parameters (Fig 3b), some weakly significant correlations were found. TNF α correlated positively with the systolic blood pressure

($r = 0.288$, $P < .05$) and IL-6 correlated with HDL-cholesterol ($r = -0.326$, $P < .05$) and triglycerides ($r = 0.251$, $P < .05$) in VAT. Meanwhile, as it can be observed in Fig 4b, CCL3 correlated with triglycerides in SAT and VAT ($r = -0.250$, $P < .05$; $r = -0.254$, $P < .05$, respectively) and with glucose in VAT ($r = -0.275$, $P < .05$). Interestingly, the CRP was negatively related to CCL2 in SAT, something expected because of CRP has been shown as an inducer of CC chemokines release.¹⁹

Lipogenesis and adipogenesis and their associations with the metabolic syndrome. Adipogenesis and the lipogenic function were assessed by the relative mRNA expression of PPARgamma and FABP4 (Fig 5a) as

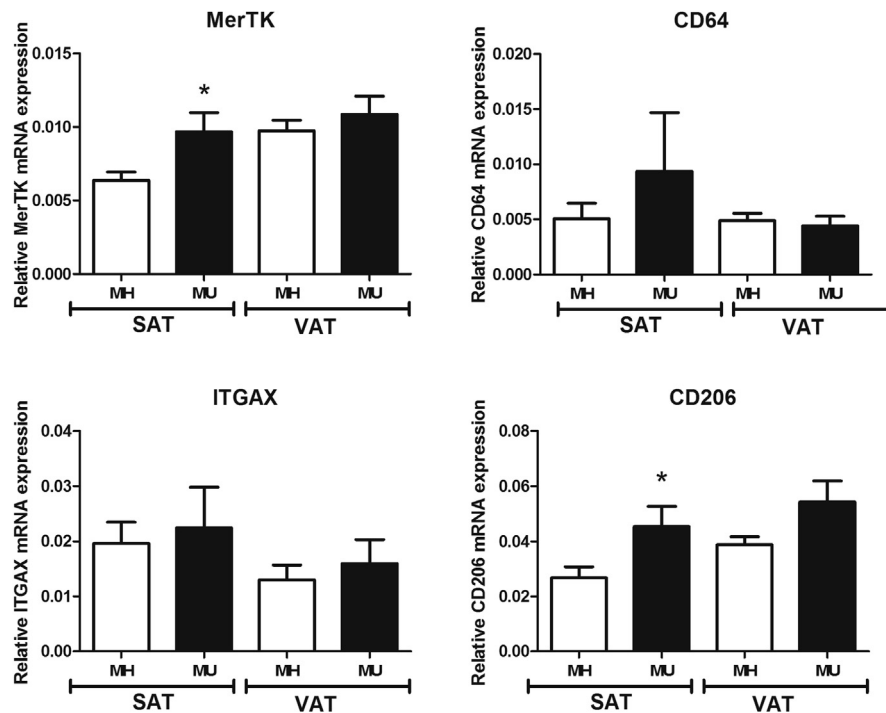


Fig 2. mRNA expression levels of monocyte/macrophage adipose tissue residents genes and markers of macrophage polarization in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues in metabolically healthy (MH; in white) and unhealthy (MU; in black) normal-weight subjects ($n = 92$, MH = 71, MU = 21). *Groups significantly different ($P < .05$).

these are 2 molecules are very active in the metabolism of glucose and fatty acids in adipose tissue. PPARgamma in SAT from MU subjects was downregulated ($P = .001$), whereas in VAT no differences were observed ($P > .05$). No differences between the study groups were detected for FABP4. Relationships were found between the 2 markers used, PPARgamma, and FABP4, because of a positive correlation between them in both tissues. Moreover, both markers in SAT correlated negatively ($P < .05$) with CD68 and CD33, whereas in VAT this negative relationship was seen with ITGAM and CD33 (data not shown).

PPARgamma was associated with some of the metabolic syndrome parameters (Fig 5b). PPARgamma showed a negative correlation with triglycerides ($r = -0.294$ $P < .05$) and a positive correlation with HDL-cholesterol ($r = 0.433$ $P < .01$).

Metabolic syndrome variables as parameters predictive of ATMs. To examine which metabolic syndrome variables are the most relevant for ATMs, we examined the effect of variables on the mRNA expression level of the markers measured that correlated significantly with the metabolic syndrome parameters (CD68, CD33, CD163, ITGAM, MerTK, and PPARgamma in SAT; and EMR-1, CD163, CD68, and Cd206 in VAT) by means of a stepwise multiple regression analysis.

As independent variables we included the parameters relative to the metabolic syndrome (glucose, waist circumference, triacylglycerols, HDL-cholesterol, systolic and diastolic blood pressures). Stepwise multiple regression analysis demonstrated that HDL-cholesterol was an independent factor associated with the relative expression of CD68 in SAT ($\beta = -0.295$, $R^2 = 0.244$; $P < .01$), and that the relative expression of PPARgamma in SAT was also related with HDL-cholesterol ($\beta = -0.295$, $R^2 = 0.232$, $P < .01$).

DISCUSSION

In the present study, we examined normal-weight subjects with different degrees of metabolic syndrome disease: MH normal-weight subjects and MU normal-weight subjects. The results provided clues concerning the idea that MU normal-weight subjects show a dysfunction in their adipose tissues, especially in their SAT. Our data provide evidence for a different degree of macrophage infiltration between the adipose tissues.

White adipose tissue (WAT) is widely recognized to influence the individual's cardiometabolic health, and for that reason exploring its morphology and function would have the potential to improve our understanding of the pathologies associated to obesity. Indeed, the use of the discordant phenotypes, such as the MU

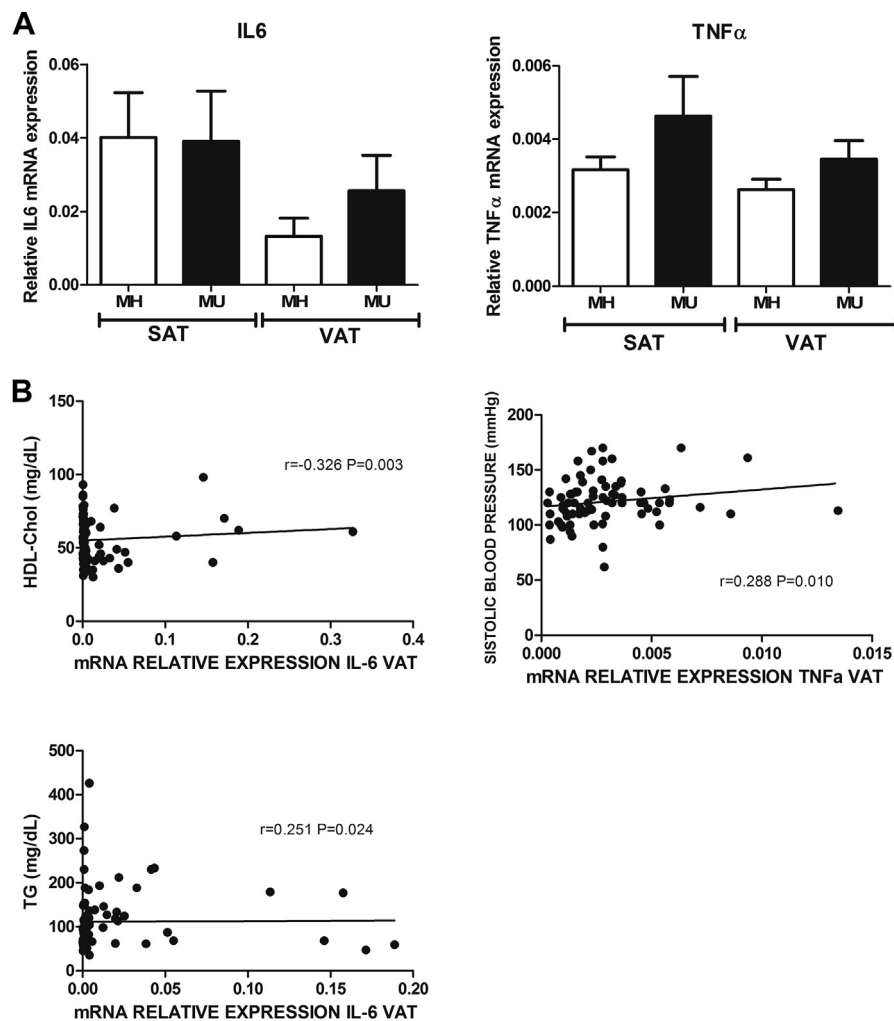


Fig 3. (A) mRNA expression levels of proinflammatory cytokine genes in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues in metabolically healthy (MH; in white) and unhealthy (MU; in black) normal-weight subjects. (B) Significant correlations of proinflammatory cytokine gene expressions in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues in relation to metabolic syndrome parameters ($n = 92$, MH = 71, MU = 21). HDL-chol, HDL cholesterol; TG, triacylglycerols.

normal-weight subjects and the MHO individuals, could contribute with clues to better understand the link between the WAT and the cardiometabolic risk, independent of body weight.

VAT is known to play a predominant role in the development of insulin resistance and inflammation,²⁰ and in this way, it has been hypothesized that increased VAT in MU patients may be a primary cause for this increase in cardiometabolic risk.²¹ This fact may be connected in our individuals with a higher waist circumference in MU individuals. However, another hypothesis postulated in MHO would indicate the location of the fat accumulation as one explanation for the reduced cardiometabolic risk of these patients.²² Thus, the focus of interest would be established on SAT, where MHO might preferentially store excess fat.^{23,24}

The presence of immune cells in WAT has an important role in the regulation of tissue function. Moreover, the population of immune cells in WAT changes with obesity and metabolic dysfunction.²⁵ Therefore, studying the immune cell population in different WAT depots will yield additional insights into the MU normal-weight subjects. Currently, most studies are based on VAT, because of a predominant macrophage infiltration in this tissue.²⁶ To the best of our knowledge, macrophage infiltration has not been examined in MU normal-weight subjects to date. In contrast, MHO individuals were found to have reduced macrophage infiltration in VAT compared with MU obese individuals, with no change observed in SAT macrophage infiltration.²³ Thus, in the present study, we show that MU normal-weight subjects presented an altered ATM

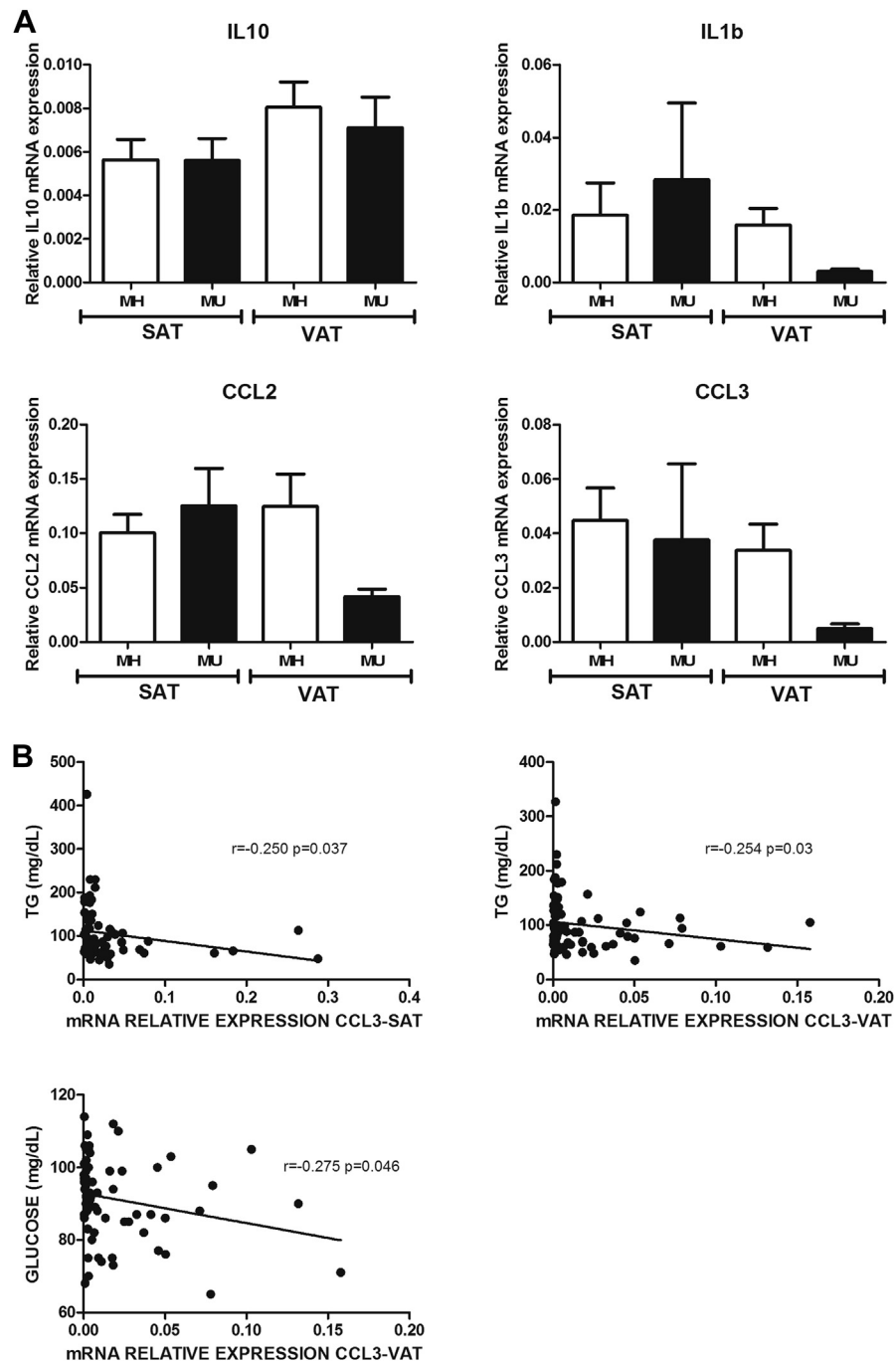


Fig 4. (A) mRNA expression levels of mediators of inflammation genes in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues in metabolically healthy (MH; in white) and unhealthy (MU; in black) normal-weight subjects. (B) Significant correlations of the mediators of inflammation gene expressions in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues in relation to metabolic syndrome parameters ($n = 92$, MH = 71, MU = 21). TG, triacylglycerols.

mRNA expression in SAT, indicating a higher amount of ATMs in this tissue than in VAT. The whole range of the macrophage/monocyte markers measured showed higher values in MU subjects.

Another important point is the nature of the infiltrated macrophages. Macrophages phenotype depends on the environment, facilitating the immune function and maintaining the tissue homeostasis.²⁷ Classically

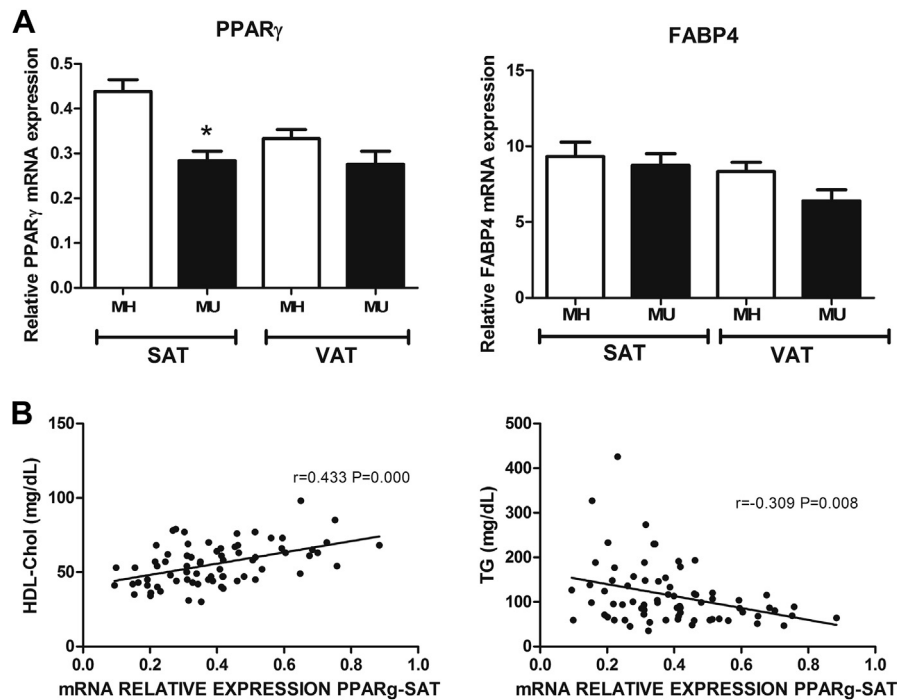


Fig 5. (A) mRNA expression levels of adipogenesis marker genes in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues in metabolically healthy (MH; in white) and unhealthy (MU; in black) normal-weight subjects. (B) Significant correlations found between adipogenesis marker gene expression in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissues in relation to metabolic syndrome parameters ($n = 92$, MH = 71, MU = 21). HDL-cholesterol; HDL cholesterol; TG, triacylglycerols. *Groups significantly different ($P < .05$).

activated M1 macrophages express ITGAX (CD11c), whereas alternatively activated M2 macrophages express high levels of CD206, although the scavenger receptor CD163 may also be a marker of M2 macrophages in humans.²⁸ Lean subjects have classically been classified as alternatively activated M2 macrophages.²⁹ In this study, ITGAX did not reach a statistical difference between the groups, but higher amounts of CD206 and CD163 have been reported in the SAT of the MU normal-weight patients, possibly indicating a M2 phenotype of these individuals.³⁰ However, it is known that ATMs have mixed states that could not be consistent with the strict M1/M2 phenotypes,³¹ and that exist a degree of phenotypic plasticity for ATMs that should be further studied.

Circulating levels of cytokines in MU normal-weight individuals are comparable to those measured in MU obese individuals.³² This highlights the idea that inflammation, irrespective of body weight, is an independent contributor to cardiometabolic risk. Alternatively activated M2 macrophages are induced by anti-inflammatory IL-10 (among others). IL-10 is essential for some kinds of M2 polarizations in lean individuals via MerTK upregulation.¹⁸ However, in our study, a higher amount of this cytokine was not observed in

MU subjects. MU normal-weight individuals have been shown to have higher blood levels of leptin, TNF α and IL6, and lower adiponectin levels compared with MH normal-weight individuals.³³ Adipose tissue macrophages are responsible for almost all the adipose tissues TNF α expression and significant amounts of IL-6 expression.⁴ In our study, the main proinflammatory cytokines, TNF α and IL-6, as well as IL-1b, CCL2 and CCL3 were also studied. However, a clear difference between both the groups was not observed for these M1 inflammatory markers. In spite of the differences found in macrophage infiltration, adipose tissue inflammation did not differ at the stages measured, although direct associations were found between macrophage infiltration and inflammation and could be related to the serum CRP, which is known to be related to the release of CC chemokines.¹⁹ Probably, this could be related with the fact that in humans macrophages in adipose tissue from lean subjects expressed a mixed M1-M2 phenotype.³⁴

Many associations between macrophage/monocyte markers and the metabolic syndrome parameters have been found. HDL-cholesterol correlates negatively with macrophage/monocyte variables like CD68, ITGAM, and CD33 in SAT, demonstrating that the first

stage of infiltration in the adipose tissue of normal-weight subjects is associated with lower HDL-cholesterol, as has also been seen in obese subjects.^{35,36} Indeed, an interesting aspect of macrophage biology is their important role in lipid and iron metabolism. HDL is sensed by macrophages and induces reprogramming of these cells, thereby repressing an inflammatory program whereas at the same time elevating the cells capacity to metabolize cholesterol.³⁷ Another parameter that seems to be affected by the infiltration of the macrophages is the systolic blood pressure, which was mostly associated with CD163 and CD68, both in SAT and in VAT. This could be explained by endothelial dysfunction and an increase in vascular resistance related to inflammatory cytokines secreted by monocytes/macrophages.³⁸ Thus, a relationship between CD163 and TNF α , similar to that found in this study, could be the explanation for the link between CD163 and blood pressure; TNF α decreases nitric oxide (NO) production and enhances NO removal in endothelial cells leading to impaired NO-mediated vasodilation.³⁸ Meanwhile, triglycerides have been related mainly with SAT, and especially with the expression of CD33, ITGAM, MerTK, and CCL3, although a direct association has been also found with CD206 in VAT. This higher relation with macrophage infiltration in SAT could be related with the fact that hypertriglyceridemia is a leukocyte activator, and for that reason it is considered as an alternative proinflammatory and proatherogenic mechanism associated with the generation of oxidative stress,³⁹ something related with the fact that M2 macrophage activation is dependent on fatty acid oxidation.⁴⁰

Another important aspect addressed in this manuscript is related to the lipogenic and adipogenic capacities of the adipose tissue. A whole transcriptome analysis of SAT in MHO subjects found that genes involved in the tricarboxylic acid cycle and branched-chain amino acids metabolism were less compromised compared with MU obese individuals, thus suggesting a more favorable SAT function in MHO individuals.⁴¹ In this manner, in this study we have observed that PPARGamma was altered, observing a downregulation in SAT. This loss of adipogenesis function could be attributed to macrophage/monocyte infiltration because of the negative relationship between adipogenic and macrophage/monocyte markers.

PPARGamma is the central gene in adipogenesis. PPARGamma modulates maturation⁴² and infiltration⁴³ of macrophages into adipose tissue; moreover, it is expressed in monocytes/macrophages, and their ligands inhibit the production of inflammatory mediators by these cells.^{43,44} These observations have raised the possibility that PPARGamma may play a physiologic role in

modulating the magnitude and duration of inflammatory responses in which macrophages play prominent roles.⁴⁵ In turn, it also plays an anti-inflammatory role by inhibiting the expression of proinflammatory molecules and macrophage migration.⁴⁶ Thus, PPARGamma controls the inflammatory potential of the macrophages and determines the macrophage phenotype in adipose tissue.⁴⁷ On the other hand, CC chemokines, such as CCL2 and CCL3, are essential for the attraction of mononuclear cells from circulation into tissues. Moreover, the function of chemokine receptors in the adipose tissue is closely linked to insulin sensitivity. Thus, CC chemokines expressed in the adipose tissue could play a role in promoting adipose tissue inflammation in relation with a metabolically dysfunction in this tissue.

Finally, PPARGamma is strongly associated with HDL-cholesterol. Recently, many theories around the importance of maintaining high HDL-cholesterol levels have been formulated. In this way, PPARGamma agonists not only have beneficial effects on glucose homeostasis, by increasing insulin sensitivity and reducing blood glucose levels, they also benefit lipid metabolism by elevating plasma HDL-cholesterol.⁴⁸ Moreover, this increase in the amount of HDL-cholesterol is accompanied by an increased quality of the HDL-cholesterol, making it a better acceptor of cellular cholesterol.⁴⁹ In this line, PPARGamma has a regulatory role in the first steps of the reverse-cholesterol-transport pathway through activation of ATP-Binding Cassette Transporter, sub-family A, member 1 (ABCA1)-mediated cholesterol efflux in human macrophages.⁵⁰ Thus, the HDL-cholesterol level seems to be the most determinant factor in normal-weight subjects in relation to their metabolic syndrome status, acting on the adipogenesis function through PPARGamma.

Although the greatest strength of this study is its novelty in the approach of the macrophage/monocyte infiltration study in MU normal-weight subjects, there are several limitations to this study. First, because of the limitations inherent to a case-control study design, it was not possible to clarify a causal relationship between the ATM content and metabolic disorders. And secondly, our results were generated from gene expression data, and so need replication using other methods such as flow cytometry. Nonetheless, previous studies showed that the expression of macrophage markers correlates well with actual infiltration in adipose tissue.^{36,51}

It can be questioned if MU normal-weight individuals will become MU obese individuals over time. The data from this study reinforce the notion that macrophage infiltration into the SAT of MU normal-weight subjects may contribute to cause metabolic disturbances leading to diabetes or cardiovascular diseases. Thus, it is possible that estimation of the macrophage content in

SAT could be used to predict the risk for metabolic disease in patients.⁵² Moreover, adipogenesis in SAT seemed to be one of the complications related with the metabolic syndrome, showing a reduction in MU subjects. The metabolic syndrome parameter most related with macrophage/monocyte infiltration was HDL-cholesterol. Thus, the increase in subcutaneous ATM infiltration may explain why some normal-weight and obese individuals develop metabolic disease whereas others remain MH. Further molecular discoveries will facilitate health management strategies targeting the adipose tissue function.

ACKNOWLEDGMENTS

Conflicts of Interest: All authors have read the journal's policy on disclosure of potential conflicts of interest and have none to declare.

The research group belongs to the “Centros de Investigación en Red” [CIBER, CB06/03/0018] of the “Instituto de Salud Carlos III”. I.M.I was supported by a “Sara Borrell” Postdoctoral contract from the Instituto de Salud Carlos III (CD12/00530). D.C.C was supported by a “Formación de Profesorado Universitario (FPU)” predoctoral contract from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU13/04211). This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria of Instituto de Salud Carlos III and co-founded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional – FEDER (PI12/02355) and the Consejería de Innovación of the Junta de Andalucía (P11-CTS-08181).

The authors thank Juan Alcaide, Lidia Sánchez-Alcoholado, and Concepción Santiago for their technical help. The authors thank Ian Johnstone for help with English language editing. The authors would like to thank the anonymous reviewers for their helpful and constructive comments that greatly contributed to improving the final version of the paper. The authors would also like to thank the editors for their generous comments and support during the review process.

Supplementary Information accompanies the article on Translational Research website (<http://www.translationalres.com>)

REFERENCES

1. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860–7.
2. Tataranni PA, Ortega E. A burning question: does an adipokine-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes? *Diabetes* 2005;54:917–27.
3. Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett* 2007;112:61–7.
4. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–808.

5. Gagnon A, Foster C, Landry A, Sorisky A. The role of interleukin 1beta in the anti-adipogenic action of macrophages on human pre-adipocytes. *J Endocrinol* 2013;217:197–206.
6. Roldan M, Macias-Gonzalez M, Garcia R, Tinahones FJ, Martin M. Obesity short-circuits stemness gene network in human adipose multipotent stem cells. *FASEB* 2011;25:4111–26.
7. Barbarroja N, Lopez-Pedraza R, Mayas MD, et al. The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochem J* 2010; 430:141–9.
8. Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes* 1998;47:699–713.
9. Dvorak RV, DeNino WF, Ades PA, Poehlman ET. Phenotypic characteristics associated with insulin resistance in metabolically obese but normal-weight young women. *Diabetes* 1999;48:2210–4.
10. St-Onge MP, Janssen I, Heymsfield SB. Metabolic syndrome in normal-weight Americans: new definition of the metabolically obese, normal-weight individual. *Diabetes Care* 2004; 27:2222–8.
11. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 2010;11:11–8.
12. Miranda M, Escote X, Ceperuelo-Mallafre V, et al. Paired subcutaneous and visceral adipose tissue aquaporin-7 expression in human obesity and type 2 diabetes: differences and similarities between depots. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3470–9.
13. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007;116:39–48.
14. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21: 697–738.
15. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte chemo-attractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2282–9.
16. Schultze JL. Transcriptional programming of human macrophages: on the way to systems immunology. *J Mol Med (Berl)* 2015;93:589–97.
17. Badoud F, Perreault M, Zulyniak MA, Mutch DM. Molecular insights into the role of white adipose tissue in metabolically unhealthy normal weight and metabolically healthy obese individuals. *FASEB* 2015;29:748–58.
18. Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, Cohen PL. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol* 2012;189: 3508–20.
19. Montecucco F, Steffens S, Burger F, Pelli G, Monaco C, Mach F. C-reactive protein (CRP) induces chemokine secretion via CD11b/ICAM-1 interaction in human adherent monocytes. *J Leukoc Biol* 2008;84:1109–19.
20. Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Despres JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2014;56:369–81.
21. Katsuki A, Sumida Y, Urakawa H, et al. Increased visceral fat and serum levels of triglyceride are associated with insulin resistance in Japanese metabolically obese, normal weight subjects with normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 2003;26:2341–4.
22. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* 2013;93:359–404.
23. Bluher M. The distinction of metabolically ‘healthy’ from ‘unhealthy’ obese individuals. *Curr Opin Lipidol* 2010;21:38–43.
24. Messier V, Karelis AD, Prud’homme D, Primeau V, Brochu M, Rabasa-Lhoret R. Identifying metabolically healthy but obese

- individuals in sedentary postmenopausal women. *Obesity* (Silver Spring, Md) 2010;18:911–7.
25. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11:738–49.
26. Bluher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009;117:241–50.
27. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008;13:453–61.
28. Morris DL, Singer K, Lumeng CN. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011;14:341–6.
29. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175–84.
30. Fjeldborg K, Pedersen SB, Møller HJ, Christiansen T, Bennetzen M, Richelsen B. Human adipose tissue macrophages are enhanced but changed to an anti-inflammatory profile in obesity. *J Immunol Res* 2014;2014:10.
31. Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation. *Curr Opin Lipidol* 2011;22:365–72.
32. Di Renzo L, Galvano F, Orlandi C, et al. Oxidative stress in normal-weight obese syndrome. *Obesity* (Silver Spring, Md) 2010;18:2125–30.
33. Hyun YJ, Koh SJ, Chae JS, et al. Atherogenicity of LDL and unfavorable adipokine profile in metabolically obese, normal-weight woman. *Obesity* (Silver Spring, Md) 2008;16:784–9.
34. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, et al. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E1016–27.
35. Ahlin S, Sjöholm K, Jacobson P, et al. Macrophage gene expression in adipose tissue is associated with insulin sensitivity and serum lipid levels independent of obesity. *Obesity* (Silver Spring, Md) 2013;21:E571–6.
36. He J, Xu X, Francisco A, Ferrante A, Krakoff J. Markers of adipose tissue macrophage content are negatively associated with serum HDL-C concentrations. *Atherosclerosis* 2011;215:243–6.
37. De Nardo D, Labzin LI, Kono H, et al. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat Immunol* 2014;15:152–60.
38. Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Bindahman LS, et al. Soluble CD163 is associated with body mass index and blood pressure in hypertensive obese Saudi patients. *Eur J Clin Invest* 2012;42:1221–6.
39. Alipour A, van Oostrom AJ, Izraeljan A, et al. Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:792–7.
40. Huang SC-C, Everts B, Ivanova Y, et al. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for macrophage alternative activation. *Nat Immunol* 2014;15:846–55.
41. Badoud F, Lam KP, DiBattista A, et al. Serum and adipose tissue amino acid homeostasis in the metabolically healthy obese. *J Proteome Res* 2014;13:3455–66.
42. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 2007;447:1116–20.
43. Stienstra R, Duval C, Keshtkar S, van der Laak J, Kersten S, Muller M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue. *J Biol Chem* 2008;283:22620–7.
44. Nagy ZS, Czimmerer Z, Szanto A, Nagy L. Pro-inflammatory cytokines negatively regulate PPARγ mediated gene expression in both human and murine macrophages via multiple mechanisms. *Immunobiology* 2013;218:1336–44.
45. Ricote M, Huang J, Fajas L, et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7614–9.
46. Nagy L, Szanto A, Szatmari I, Szeles L. Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response. *Physiol Rev* 2012;92:739–89.
47. Charo IF. Macrophage polarization and insulin resistance: PPAR-gamma in control. *Cell Metab* 2007;6:96–8.
48. Verges B. Clinical interest of PPARs ligands. *Diabete Metab* 2004;30:7–12.
49. Fournier N, Tuloup-Minguez V, Pourci ML, et al. Fibrate treatment induced quantitative and qualitative HDL changes associated with an increase of SR-BI cholesterol efflux capacities in rabbits. *Biochimie* 2013;95:1278–87.
50. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001;7:53–8.
51. Ortega Martinez de Victoria E, Xu X, Koska J, et al. Macrophage content in subcutaneous adipose tissue: associations with adiposity, age, inflammatory markers, and whole-body insulin action in healthy Pima Indians. *Diabetes* 2009;58:385–93.
52. De Lorenzo A, Bianchi A, Maroni P, et al. Adiposity rather than BMI determines metabolic risk. *Int J Cardiol* 2013;166:111–7.

Appendix**PREVALIDATED TAQMAN PRIMER/PROBE SETS**

Cyclophilin A (4326316E, RefSeq. [NM_021130.3](#))
used as endogenous control for the target gene in each reaction.

TNF α (Hs 01113624_g1, RefSeq [NM_000594.3](#)).

IL6 (Hs 00985639_m1, RefSeq [NM_000600.3](#)).

PPARgamma (Hs 01115513-m1, RefSeq [NM_015869.4](#)).

CD11b (Hs 00355885_m1, RefSeq [NM_000632.3](#)).

CD33 (Hs 01076281_m1, RefSeq [NM_001082618.1](#)).

EMR1 (Hs 00892591_m1, RefSeq [NM_001256252.1](#)).

CD68 (Hs 02836816_g1, RefSeq [NM_001040059.1](#)).

CD163 (Hs 00174705_m1, refSeq [NM_004244.5](#)).

FABP4 (Hs 01086177_m1, RefSeq [NM_001442.2](#)).

CD206 (Hs00267207_m1, RefSeq [NM_002438.3](#)).

CD11c (Hs00174217_m1, RefSeq [NM_000887.3](#)).

MerTK (Hs01031973_m1, RefSeq [NM_006343.2](#)).

CD64 (Hs00417598_m1, RefSeq [NM_001017986.3](#),
[NM_001244910.1](#), [NM_000566.3](#)).

IL-10 (Hs00961622_m1, RefSeq [NM_000572.2](#)).

IL1b (Hs00174097_m1, RefSeq [NM_000576.2](#)).

CCL2 (Hs00234140_m1, RefSeq [NM_002982.3](#)).

MIP1alpha (Hs00234142_m1, RefSeq [NM_002983.2](#)).

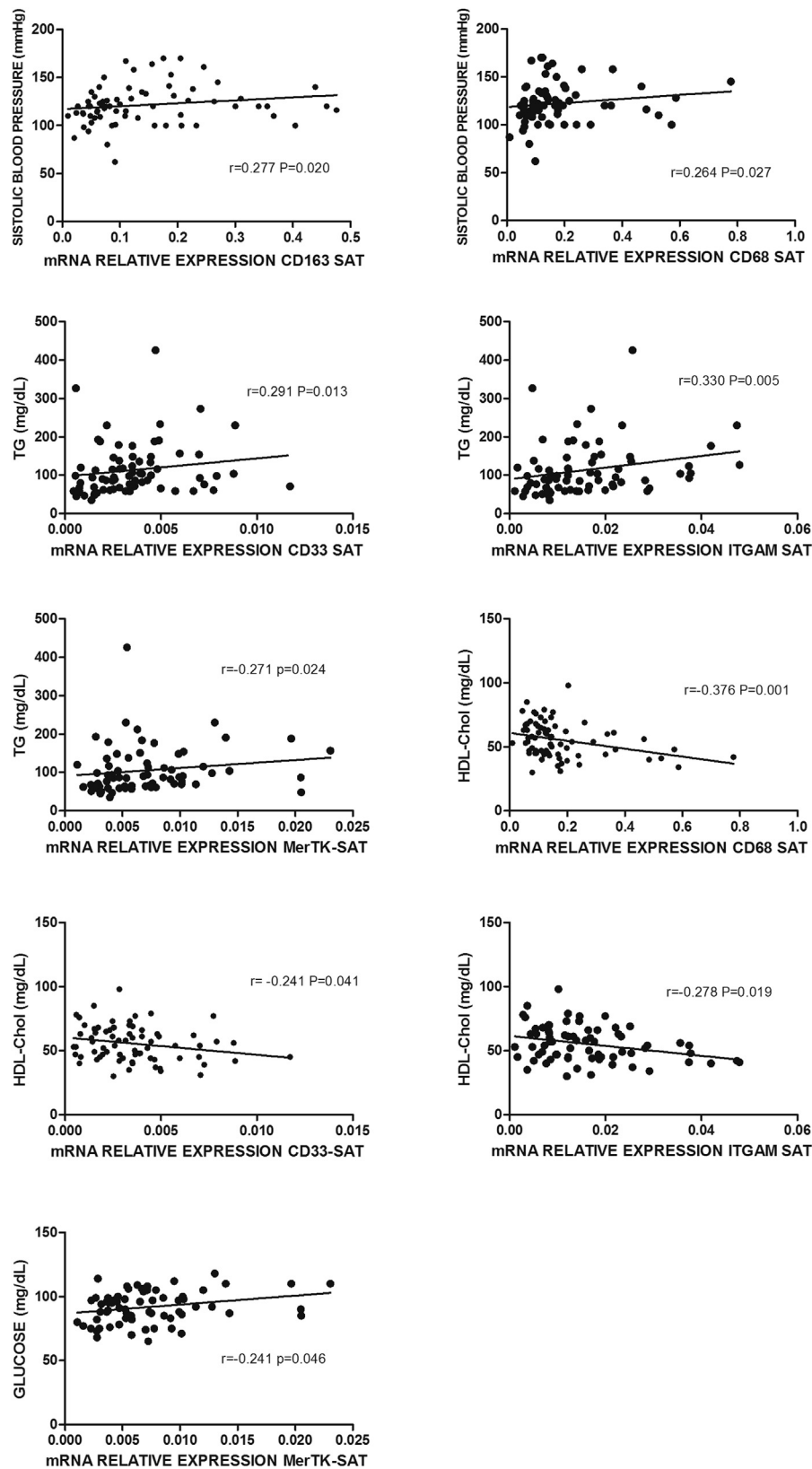


Fig S1. Significant correlations of monocyte/macrophage marker gene expression in subcutaneous (SAT) adipose tissues in relation with metabolic syndrome parameters ($n = 92$, MH = 71, MU = 21). HDL-cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triacylglycerols.

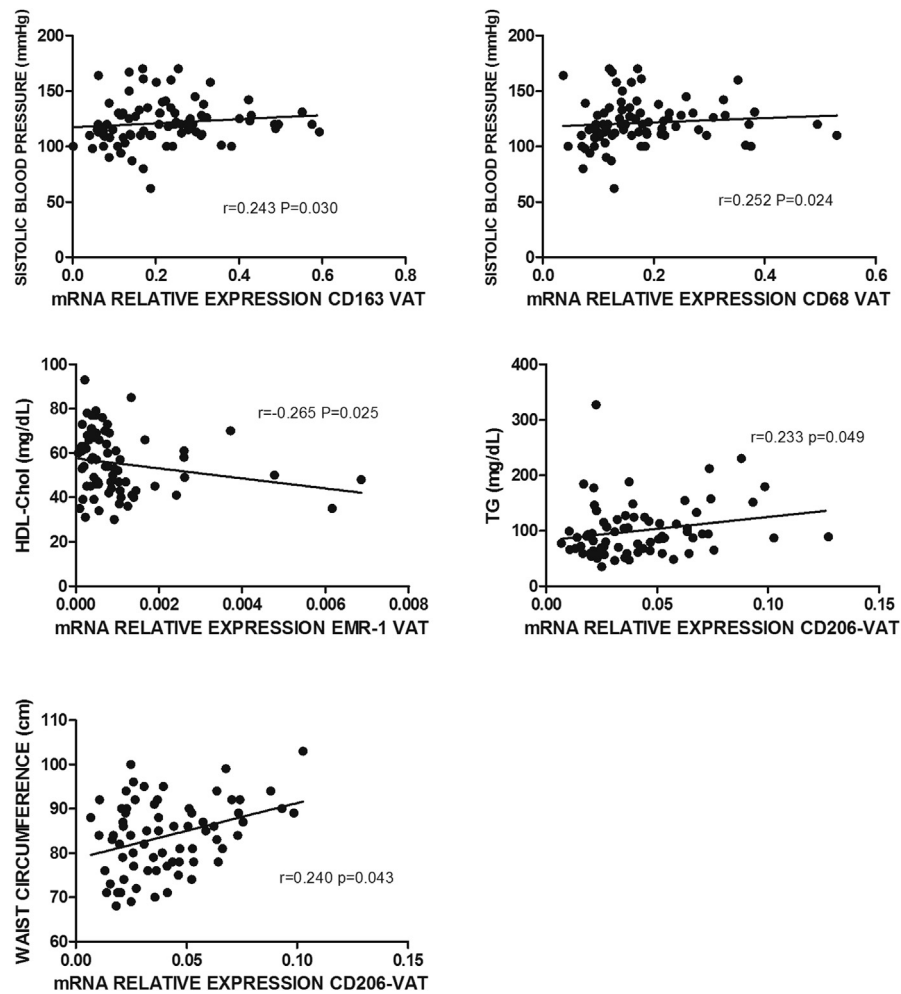


Fig S2. Significant correlations of monocyte/macrophage marker gene expression in visceral (VAT) adipose tissues in relation with metabolic syndrome parameters ($n = 92$, MH = 71, MU = 21). HDL-chol, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triacylglycerols.

COMMENTARY

Metabolic dysfunction and adipose tissue macrophages: is there more to glean from studying the lean?



Comment on "Adipose tissue infiltration in normal-weight subjects and its impact on metabolic function" by Moreno-Indias et al.

DAVID L. MORRIS, and CARMELLA EVANS-MOLINA

INDIANAPOLIS, IND

Metabolic syndrome is a serious health condition that affects approximately 34% of adults. Hallmarks of this syndrome include abdominal obesity, elevated triglycerides, reduced high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels, hypertension, hyperglycemia, and insulin resistance, and those affected are at heightened risk for the development of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and stroke. Over the past 20 years, an increasing role for low grade, sterile inflammation in insulin resistance and metabolic syndrome has been appreciated. Studies have shown that obesity induces an inflammatory state that is clinically manifested as altered concentrations of acute-phase response proteins (eg, increased C-reactive

protein), proinflammatory cytokines (eg, increased interleukin [IL]-6 and tumor necrosis factor [TNF] α), adipokines (eg, reduced adiponectin and elevated resistin and leptin), coagulation factors (eg, increased plasminogen activator inhibitor-1), and increased white blood cell counts in the circulation. Data from rodent models and clinical samples support the idea that the vast majority of these proinflammatory mediators primarily originate from expanding adipose tissue depots. A variety of leukocytes (eg, macrophages, monocytes, dendritic cells, eosinophils, neutrophils, T cells, B cells, and natural killer T [NKT] cells) are now known to reside in adipose tissue, and these cells are either activated or recruited to fat in response to obesity. Infiltrating immune cells, and the proinflammatory cytokines/chemokines they produce, interact with metabolically stressed cells to generate a proinflammatory milieu that exacerbates insulin resistance not only in fat but in multiple metabolic tissues to promote metabolic syndrome.

Adipose tissue macrophages (ATMs) are the most abundant immune cell population in fat and were the first tissue leukocyte population linked to obesity-induced metabolic disease and inflammation in both mouse models and humans.^{1,2} Tissue macrophages adapt a range of functional activation states, with "classically activated," proinflammatory M1 macrophages and "alternatively activated," anti-inflammatory M2 macrophages representing extreme ends of a continuum.³ In lean mice and humans, ATMs in visceral fat are "M2-like," reside between adipocytes, produce anti-inflammatory cytokines (eg,

DOI of original article: 10.1016/j.trsl.2016.01.002.

From the Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Ind 46202, USA; The Roudebush VA Medical Center, Indianapolis, Ind 46202, USA; The Herman B Wells Center for Pediatric Research, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Ind 46202, USA; Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Ind 46202, USA; Department of Cellular and Integrative Physiology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Ind 46202, USA.

*Reprint requests: David L. Morris, PhD or Carmella Evans-Molina, MD, PhD, Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, 635 Barnhill Drive, MS 2031, Indianapolis, IN 46202; e-mail: davmorri@iu.edu, cevanmo@iu.edu.

1931-5244/\$ - see front matter

Published by Elsevier Inc.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2016.02.010>

IL-10), and contribute to tissue homeostasis.⁴⁻⁶ In response to obesity, a second phenotypically and functionally distinct population of macrophages accumulates in fat. These ATMs express markers of proinflammatory M1 macrophages and produce proinflammatory cytokines (eg, TNF α , IL-1 β , and IL-6) known to impair insulin sensitivity in adipose tissue.^{4,7-12} In mice, “M1-like” ATMs are recruited in response to lipolysis¹³ and aggregate around dead and hypoxic adipocytes,^{14,15} suggesting that metabolic stress is a primary driving force for macrophage recruitment in adipose tissue. Collectively, these and other findings led to the “phenotypic switch” model, which proposes that obesity induces a collective shift in the activation state of ATMs from an anti-inflammatory “M2-like” state that protects adipocytes to a proinflammatory “M1-like” state that contributes to insulin resistance.⁴ More recently, this linear paradigm has been challenged by proteomic studies demonstrating that human macrophages in fat have a “metabolically activated” phenotype that differs from classical M1 polarization.¹⁶ Nonetheless, it is clear that macrophages accumulate in fat depots with obesity, and these cells can alter the inflammatory milieu to promote local and systemic dysfunction.

Even as being overweight (body mass index [BMI] = 25–29.9 kg/m²) and obese (BMI \geq 30 kg/m²) is strongly associated with the likelihood of developing adipose tissue inflammation and insulin resistance, a fraction of obese people never fully manifest metabolic syndrome, insulin resistance, or diabetes.^{17,18} These “metabolically healthy (MH) obese” individuals provide unique insight into pathogenesis of metabolic disease. Paradoxically, epidemiologic studies indicate that a subset of individuals with “normal” body weight (BMI <24.9 kg/m²) may also develop insulin resistance and metabolic syndrome during their lifetime. Although the latter are more rarely studied, “metabolically unhealthy (MU) lean” subjects may hold equally important new clues into the origins of metabolic syndrome and its sequela.

In this issue of *Translational Research*, Moreno-Indias et al. have attempted to address this knowledge gap. The authors investigated the expression levels of human macrophage markers, including CD68, CD33, CD11c, CD163, MerTK, CD64, and CD206, in visceral and subcutaneous adipose tissue (SAT) depots in normal-weight (BMI <24.9 kg/m²) subjects stratified into MH or MU populations, based on indices of metabolic syndrome.¹⁹ Despite having comparable BMI, the MU group had significantly elevated fasting glucose, higher triglyceride levels, increased total and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels, and lower HDL cholesterol levels than the MH group. As

predicted, MU subjects had more relative insulin resistance, as indicated by increased HOMA-IR levels, as well as elevated serum insulin and c-peptide levels.

Despite marked differences in metabolic indices between MH and MU, there were no differences in the expression of macrophage markers in visceral adipose tissue between the two groups. This was surprising given the relationship between visceral/omental fat inflammation, ATM content, and insulin resistance/metabolic syndrome previously documented in obese adults. Furthermore, although serum C-reactive protein levels were higher in MU subjects, the expression of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF α) and chemokines associated with leukocyte recruitment (CCL2 and CCL3) was not different between groups, irrespective of the adipose tissue depot surveyed. Rather, CD68, CD11c, CD163, CD33, MerTK, and CD206 messenger RNA levels were unexpectedly elevated in SAT from MU subjects. Notably, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) expression was also lower in SAT from MU subjects, suggesting a relationship between adipose tissue dysfunction and macrophage infiltration in the subcutaneous depot.

These findings fall in line with other reports. For instance, Wentworth et al.¹¹ reported that CD11c + CD206+ ATMs accumulate in visceral as well as subcutaneous depots collected from obese women. Notably, the number of CD11c + CD206+ ATMs was even greater in obese subjects with metabolic syndrome. In a more recent study, the expression of CD163 in subcutaneous fat was previously shown to positively correlate with HOMA-IR in obese patients.²⁰ Although CD11c + CD206+ or CD163+ ATMs were not enumerated in the present study, the transcriptional profile (elevated macrophage markers with reduced PPAR γ expression) supports a model in which ATMs accumulate in SAT to potentially promote insulin resistance and metabolic dysfunction in that depot. What sets the work of Moreno-Indias et al. apart is the documentation of these phenomena in normal-weight subjects with indices of metabolic syndrome, suggesting an important but largely unexplored link between ATMs and metabolic syndrome that arises independent of obesity and inflammation in visceral fat.

At the same time, the Moreno-Indias study reminds us of the “chicken-and-egg” question that continues to remain largely unanswered—Does recruitment of ATMs to fat depots cause insulin resistance and metabolic dysfunction, or does insulin resistance/metabolic dysfunction precipitate recruitment of ATMs to fat? Studies in mice models of obesity (both genetic and diet induced) largely favor the hypothesis that accumulating, proinflammatory ATMs promote chronic tissue inflammation and exaggerate insulin resistance.^{1,2,4,21}

Certainly, ablating macrophages in obese mice or preventing macrophage recruitment into adipose tissue improves glucose tolerance, insulin sensitivity, and metabolic function.²²⁻²⁴ However, there are also studies that suggest metabolic dysfunction precedes ATM recruitment and activation. For example, induced lipolysis¹³ and adipocyte apoptosis²⁵ result in massive infiltration of ATMs to visceral fat in the mouse. More recently, the Czech laboratory demonstrated that circulating cytokine profiles more closely associate with serum insulin levels rather than BMI in human subjects and that pharmacologically correcting hyperinsulinemia and hyperglycemia in obese mice limits ATM accumulation and adipose tissue inflammation.²⁶ The effects in mice may be explained, at least in part, by direct effects of obesity, hyperglycemia, hyperinsulinemia, or a combination thereof on the process of myelopoiesis,²⁷⁻²⁹ which would give rise to pools of monocytes capable of infiltrating adipose tissue, ultimately giving rise to proinflammatory ATMs. Notably, one recent human study reported that monocyte and lymphocyte markers are increased in subcutaneous fat of obese women following 3-hour-long hyperglycemic clamps.³⁰ Although Tencerova et al. did not assess ATM content, their work suggests that hyperglycemia may provoke a coordinated immune response in adipose tissue.

Study limitations make it difficult to establish a clear causal relationship between adipose tissue leukocyte content, inflammation, and indices of metabolic syndrome in human subjects. In the future, the Precision Medicine Initiative could be leveraged to support studies aimed at assessing the contribution of various adipose tissue leukocytes to tissue inflammation longitudinally in metabolically defined populations. Given the sheer volume of bariatric procedures performed in this country annually, and the high retention rates in the National Institutes of Health Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery consortium,³¹ it seems reasonable that prospective, multi-site studies can address the relationship between surgery-induced weight loss, changes in adipose tissue immune cell composition, and insulin sensitivity over time. By contrast, determining whether leukocyte infiltration and proinflammatory activation leads to metabolic disease in humans will be a much more challenging endeavor, as this pathophysiology could take decades to develop. Nonetheless, the findings by Moreno-Indias et al. suggest that studying an often overlooked population—the MU lean—may also lead to advances. Clearly new prospective studies should include as many metabolic parameters from as many divergent phenotypic populations as possible, as it is becoming increasingly clear that BMI alone is not strongly correlated

with adipose tissue leukocytosis, metabolic syndrome, and disease risk.

To be successful, new research initiatives also have to address another recurring limitation of human studies: getting the most information from a small biospecimen. Most laboratories have the capacity to perform gene expression profiling or cytokine measurements from fat biopsies. Although this gives a general sense as to the relative state of inflammation or leukocyte infiltration within the fat depots, this approach fails to take into consideration the cellular complexity of adipose tissue and the wide heterogeneity of adipose tissue leukocytes. For example, CD206 is expressed by at least 2 distinct populations of macrophages in human fat^{11,20,32}; therefore, CD206 messenger RNA levels can only serve as a surrogate for macrophage accumulation and cannot be used to infer which macrophage subset is amassing. To overcome this limitation, tissue dissociation and flow cytometry techniques have been developed that allow for not only the enumeration and immunophenotyping of adipose tissue stromal cells but also isolation of these cells for gene expression profiling and functional studies.³³⁻³⁵ Nonetheless, our collective understanding of the immune cell repertoire in human adipose tissue depots is still in its infancy. Emerging “-omics” techniques, including single-cell RNA-seq and mass cytometry (eg, CyTOF), have the capacity to deeply interrogate the transcriptome and proteome (and underlying systems biology) of rare tissue leukocytes with single cell resolution.³⁶⁻³⁸ Adopting these platforms, developing suitable workflows for limited adipose tissue samples (eg, needle biopsies) from a variety of depots, and implementing unbiased computational analysis of the resulting data sets promises to greatly accelerate our basic understanding of human adipose tissue leukocyte diversity in lean and obese subjects.

Given the prevalence of obesity and metabolic syndrome, understanding the underlying biology of human adipose tissue inflammation and its relationship with cardiovascular disease, type 2 diabetes, and stroke is a question of paramount importance. Specifically, findings presented by Moreno-Indias et al. in this issue suggest that adipose tissue leukocytes may also be key determinants of metabolic fitness even in normal-weight subjects. Clearly, their results suggest there is more to glean from studying the lean.

ACKNOWLEDGEMENTS

Conflicts of interest: All authors have read the journal's policy on disclosure of potential conflicts of interest and have none to declare.

D.L.M. is supported by a Mentored Research Scientist Career Development Award from the National Institutes of Health (K01 DK100515). Research in C.E.-M.'s laboratory is supported by grants from the National Institutes of Health (R01 DK093954 and UC4 DK104166), a Veteran's Affairs Merit Award (1I01BX001733), JDRF grant SRA-2014-41, and by grants from Sigma Beta Sorority, the George and Frances Ball Foundation, and the Ball Bros. Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the article.

REFERENCES

- Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–808.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821–30.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23:549–55.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175–84.
- Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007;56:2910–8.
- Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS, Obin MS. Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 2010;59:1171–81.
- Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 2006;74:443–77.
- Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E166–74.
- Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007;56:16–23.
- Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab* 2010;12:593–605.
- Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, et al. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* 2010;59:1648–56.
- Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011;17:179–88.
- Kosteli A, Sgaru E, Haemmerle G, et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* 2010;120:3466–79.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005;46:2347–55.
- Murano I, Barbatelli G, Parisani V, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures (CLS), are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 2008;49:1562–8.
- Kratz M, Coats BR, Hisert KB, et al. Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab* 2014;20:614–25.
- Tomiya AJ, Hunger JM, Nguyen-Cuu J, Wells C. Misclassification of cardiometabolic health when using body mass index categories in NHANES 2005–2012. *Int J Obes (Lond)* 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2016.17>. [Epub ahead of print].
- Pajunen P, Kotronen A, Korpi-Hyovalti E, et al. Metabolically healthy and unhealthy obesity phenotypes in the general population: the FIN-D2D survey. *BMC Public Health* 2011;11:754.
- Moreno-Indias I, Oliva-Olivera W, Omiste A, et al. Adipose tissue infiltration in normal-weight subjects and its impact on metabolic function. *Transl Res* 2016 [Epub ahead of print].
- Fjeldborg K, Pedersen SB, Moller HJ, et al. Human adipose tissue macrophages are enhanced but changed to an anti-inflammatory profile in obesity. *J Immunol Res* 2014;2014:309548.
- Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* 2008;57:3239–46.
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 2005;116:115–24.
- Patsouris D, Li PP, Thapar D, et al. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab* 2008;8:301–9.
- Tamura Y, Sugimoto M, Murayama T, et al. Inhibition of CCR2 ameliorates insulin resistance and hepatic steatosis in db/db mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2195–201.
- Fischer-Posovszky P, Wang QA, Asterholm IW, Rutkowski JM, Scherer PE. Targeted deletion of adipocytes by apoptosis leads to adipose tissue recruitment of alternatively activated M2 macrophages. *Endocrinology* 2011;152:3074–81.
- Pedersen DJ, Guilherme A, Danai LV, et al. A major role of insulin in promoting obesity-associated adipose tissue inflammation. *Mol Metab* 2015;4:507–18.
- Nagareddy PR, Murphy AJ, Stirzaker RA, et al. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metab* 2013;17:695–708.
- Nagareddy PR, Kraakman M, Masters SL, et al. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metab* 2014;19:821–35.
- Singer K, DelProposto J, Morris DL, et al. Diet-induced obesity promotes myelopoiesis in hematopoietic stem cells. *Mol Metab* 2014;3:664–75.
- Tencerova M, Kracmerova J, Krauzova E, et al. Experimental hyperglycemia induces an increase of monocyte and T-lymphocyte content in adipose tissue of healthy obese women. *PLoS One* 2015;10:e0122872.
- Gourash WF, Ebel F, Lancaster K, et al. Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS): retention strategy and results at 24 months. *Surg Obes Relat Dis* 2013;9:514–9.
- Aron-Wisniewsky J, Tordjman J, Poitou C, et al. Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4619–23.
- Grant R, Youm YH, Ravussin A, Dixit VD. Quantification of adipose tissue leukocytosis in obesity. *Methods Mol Biol* 2013;1040:195–209.
- Orr JS, Kennedy AJ, Hasty AH. Isolation of adipose tissue immune cells. *J Vis Exp* 2013;75:e50707.

35. Cho KW, Morris DL, Lumeng CN. Flow cytometry analyses of adipose tissue macrophages. *Methods Enzymol* 2014;537: 297–314.
36. Saliba AE, Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J. Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res* 2014;42: 8845–60.
37. Nair N, Mei HE, Chen SY, et al. Mass cytometry as a platform for the discovery of cellular biomarkers to guide effective rheumatic disease therapy. *Arthritis Res Ther* 2015;17:127.
38. Proserpio V, Lonnberg T. Single-cell technologies are revolutionizing the approach to rare cells. *Immunol Cell Biol* 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2015.106>. [Epub ahead of print].